

Analyse intrazellulärer Fluide mittels orts- und zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie

Von der Universität Bayreuth
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

von
Andreas Dénes Veres
aus Nagyvárad
(Großwardein, Rumänien)

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Weiss
2. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Köhler

Tag der Einreichung: 18.09.18
Tag des Kolloquiums: 06.12.18

Kurzzusammenfassung

Die quantitative Biophysik konnte in den vergangenen Jahren viele bedeutende Fortschritte erzielen. Unter Zuhilfenahme verschiedener Fluoreszenzspektroskopietechniken gelang es, neue Einsichten in die Selbstorganisation des Zellinneren und die Dynamik zellulärer Proteine zu gewinnen. Für die pharmakologische, medizinische und biophysikalische Forschung ist neben der Proteindynamik auch das Verständnis zellulärer Mechanismen und Reaktionen auf externen Stress von höchster Bedeutung. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der räumlich aufgelösten Stressantwort zellulärer Fluide. Intrazellulärer Stress wird über die räumlich spezifische Antwort nanoskopischer Sensoren in lebenden Zellen quantifiziert. Hierbei wird ausgenutzt, dass diese molekularen Sensoren durch die Wechselwirkung mit ihrer Mikroumgebung photophysikalische Veränderungen zeigen. Diese Stressantwort verschiedener Zelllinien, hervorgerufen durch chemotherapeutische, oxidative und hyperosmotische Behandlung, kann demnach mit Hilfe von Lebenszeit- und Intensitätsmessungen der Fluoreszenz bestimmt werden. Die kompartimentspezifische Untersuchung von HeLa (humane Zervixkarzinom)-Zellen mit Hilfe des molekularen Rotors DASPMI zeigt sowohl im chemotherapeutischen als auch im oxidativen Stresszustand, hervorgerufen durch Cisplatin und H_2O_2 , einen deutlichen Rückgang der mitochondrialen Viskosität. Zusätzlich zu diesen Untersuchungen wird ein schneller Segmentierungsalgorithmus für die Zuweisung zellulärer Kompartimente im Phasorraum vorgeschlagen. Diese Methode nutzt die Funktionalität molekularer Rotoren, ihre Lebenszeitfraktionen abhängig von ihrer Mikroumgebung zu verändern während sie zur selben Zeit größtenteils von der Fluoreszenzlöschung unbeeinflusst bleiben. Mit Hilfe von CellRox-DeepRed, einem durch Oxidation aktivierten molekularen Sensor, lässt sich in HPV (humanes Papillomavirus)-positiven HeLa-Zellen ein Rückgang von Antioxidantien nach der Behandlung mit Menadion und der damit einhergehenden Hemmung der Glutathion-Peroxidase nachweisen. In diesem Projektabschnitt wird die Sensitivität verschiedener Auswertemethoden geprüft um geringe Unterschiede in Lebenszeitmessungen zu detektieren. Über die FRET-Effizienz des molekularen Klappsensors fCrH2 lassen sich Informationen über den Gedrängtheitszustand zellulärer Fluide unter verschiedenen osmotischen Bedingungen gewinnen. Dieser Sensor wird sowohl in der nukleoplasmischen als auch zytoplasmischen Region exprimiert und ist in der Lage, räumlich aufgelöst Aussagen über die Gedrängtheit der betreffenden Fluide zu treffen. Es zeigt sich, dass fCrH2 für die Unterscheidung verschiedener osmotischer Bedingungen in lebenden Zellen sehr gut geeignet ist und osmolaritätsunabhängig intrazelluläre Unterschiede, wenn auch gering signifikant, mit seiner Hilfe aufgedeckt werden können. Um räumlich-zeitliche Korrelationen in zellulären Fluiden quantifizieren zu können und dem Lehrstuhl eine neue Mikroskopietechnik zur Verfügung zu stellen, wird ein optischer Aufbau entwickelt, beschrieben und mittels geometrischer und Fourieroptik charakterisiert. Das Setup ermöglicht mittels Verwendung der invertierten Lichtblattnikroskopie schnelle Fluoreszenzbildgebung mit freier Messbereichswahl.

Abstract

Over the past years major progress has been made in the field of quantitative biophysics regarding the self-organization of the cellular interior and protein dynamics by a multitude of fluorescence measurement techniques. Beyond mere dynamics, understanding cellular mechanisms and responses to external stress is of great importance for pharmaceutical and medical, as well as biophysical research. This thesis focuses on the spatially resolved stress-response of cellular fluids. Methods to quantify cellular stress are based on the locus-specific feedback given by nanoscopic molecular sensors inside living cells. These stress-translating molecules are known to change their photophysical properties through interaction with their micro-environment. The photophysical response to chemotherapeutical, oxidative and hyperosmotic stress induced by various stress-agents in different cell lines before and after drug treatment are analyzed by fluorescence lifetime and intensity measurements. Exploring the compartment-specific response of HeLa (*human cervical carcinoma*) cells to chemotherapeutical and oxidative stress with the help of the molecular rotor DASPMI reveals a significant decrease of mitochondrial viscosity after treatment with cisplatin as well as H_2O_2 . Additionally, a rapid and novel segmentation algorithm separating cellular compartments in phasor space is proposed. This phasor segmentation technique is based on the functionality of molecular rotors that shift their fluorescence lifetime contributions with respect to their surrounding and furthermore demonstrate negligible affinity to fluorescence quenching effects. CellRox-DeepRed, a sensor photoactivated by reactive oxygen species, reveals a decline of antioxidants in HPV (*human papilloma virus*)-positive HeLa-cells after the menadione-induced suppression of glutathione synthesis. In this context, several evaluation techniques are investigated, focusing on their reliability to distinguish small measurement differences in fluorescence lifetime data sets. Intracellular crowding measurements elucidate the ability of a crowding-sensor, fCrH2, to differentiate cellular fluids under different osmotic conditions. The folding and unfolding dynamics of this FRET-sensor, expressed in the nucleoplasmic and cytoplasmic region of HeLa-cells, provides information on the crowding-state of their surrounding. In this project the excellent sensitivity to hyperosmotic stress as well as the much lower but still measurable locus specificity of this molecular sensor is presented. In the scope of enabling spatiotemporal correlation measurements, a custom made microscope is described and characterized by means of geometrical as well as Fourier optics. The presented spectroscopic setup enables fast and scalable wide-field fluorescence applications utilizing the technique of inverted light-sheet microscopy.

Artikel

1. A. Veres, O. Stiehl und M. Weiss, *Monitoring Subcellular Stress Response via a Cell-permeant Rotor Dye*. Journal of Fluorescence, (2018), 28(2), S 605 - 613.
2. C.M. Ferencz, G. Guigas, A. Veres, B. Neumann, O. Stemmann und M. Weiss, *In Vitro Reconstitution of the Endoplasmic Reticulum*. Current Protocols in Cell Biology, (2017), 76, S 11.22.1 - 11.22.16.
3. C.M. Ferencz, G. Guigas, A. Veres, B. Neumann, O. Stemmann und M. Weiss, *Shaping the endoplasmic reticulum in vitro*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, (2016), 1858(9), S 2035 - 2040.

Konferenzbeiträge

1. Andreas Veres, Sven Bauernfeind und Matthias Weiss, *Topological and geometrical properties of mitochondrial networks*. DPG-Frühjahrstagung, Poster, (2015).
2. Andreas Veres, Csilla Ferencz und Matthias Weiss, *Sub-diffraction imaging of cellular organelles*. DPG-Frühjahrstagung, Poster, (2014).
3. Andreas Veres und Matthias Weiss, *Pitfalls and artifacts in two-focus fluorescence fluctuation spectroscopy*. DPG-Frühjahrstagung, Poster, (2013).

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	3
Abstract	5
Publikationen	7
Vorwort und Aufbau der Arbeit	13
I. Einleitung	17
1. Grundlagen	19
1.1. Die eukaryotische Zelle	19
1.2. Photophysik und Fluorophore	22
1.2.1. Fluoreszenz	22
1.2.2. Die Lebenszeit der Fluoreszenz und Fluoreszenzlöschung	24
1.2.3. Förster Resonance Energy Transfer	25
1.3. Fluoreszenzmikroskopie	25
1.3.1. Epifluoreszenzmikroskopie	26
1.3.2. Laserabtastmikroskopie	28
2. Materialien und Observablen	30
2.1. Zellkultur	30
2.2. Molekularer Rotor - Viskosität	31
2.3. Redox-Sensor - oxidativer Stress	32
2.4. Crowding-Sensor - lokale Gedrängtheit	33
3. Messmethoden und Datenauswertung	36
3.1. Fluorescence Lifetime Measurement Techniken	36
3.1.1. Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy	38
3.1.2. Fluorescence Lifetime Point Measurement	40
3.2. Datenauswertung	41
3.2.1. Korrektur der Ankunftszeithistogramme	41
3.2.2. Auswertung über Kurvenanpassung	42

3.2.3.	Phasor - Theorie und Methode	43
3.2.4.	Phasor-Analyse experimenteller Ankunftszeithistogramme . . .	46
3.2.5.	Fehler und Fehlerrechnung	48
3.2.6.	Statistische Signifikanz und Signifikanztests	51
II.	Zelluläre Reaktionen auf <i>in vivo</i> Stress	53
	Motivation und Projektübersicht	55
4.	Molekularer Rotor als viskositätssensitiver Stresssensor	57
4.1.	Materialien und Methoden	58
4.1.1.	Zellbehandlung ^[1]	58
4.1.2.	FLIM-Experimente ^[1]	59
4.1.3.	Autofluoreszenz-Messungen	59
4.2.	Sensorspezifische Stressantwort und Viskositätssensitivität	60
4.2.1.	Lebenszeitanalyse	60
4.2.2.	Fraktionsanalyse	61
4.2.3.	Autofluoreszenz von Cisplatin	67
4.3.	Kompartimentseparation mittels molekularer Rotoren	70
4.3.1.	<i>Phasor-Slicing</i>	71
4.3.2.	Resultate	74
4.3.3.	Spezifitätscharakterisierung	75
4.4.	Diskussion	77
4.4.1.	DASPMI in der Anwendung als Stresssensor	77
4.4.2.	Viskositätsspezifität und <i>Phasor-Slicing</i>	78
4.4.3.	Zusammenfassung	78
5.	Oxidativer Stress in lebenden Zellen	80
5.1.	Materialien und Methoden	81
5.1.1.	Vorbereitung der HeLa- und U2OS-Zellen	81
5.1.2.	Fluoreszenzmikroskopie und Intensitätsmessung	82
5.1.3.	FLIM-Experimente	83
5.1.4.	FLPM-Experimente	83
5.1.5.	Prüfung der Autofluoreszenz von Menadion	83
5.2.	Photophysikalische Charakterisierung des Redox-Sensors	84
5.2.1.	Verteilungsverhalten der Ankunftszeithistogramme	84
5.2.2.	Korrelation der Photonenankunftszeiten	85
5.3.	Intensitätscharakteristik der Stressantwort	88
5.4.	Lebenszeitcharakteristik der Stressantwort	89
5.4.1.	Analyse über doppelexponentielle Kurvenanpassung	89
5.4.2.	Phasor-Analyse	94
5.4.3.	Zellensemble-Phasor-Analyse	99
5.5.	Diskussion	103
5.5.1.	Zuverlässigkeit der verwendeten Auswertemethoden	103

5.5.2. Diskussion der Resultate	105
6. Kompartimentspezifische intrazelluläre Gedrängtheit	109
6.1. Materialien und Methoden	111
6.1.1. Transfektion der Zellen	111
6.1.2. Herstellung von hyperosmotischem Mikroskopiemedium	111
6.1.3. Experimente	111
6.2. Resultate	114
6.2.1. Unterscheidbarkeit intrazellulärer Gedrängtheit	115
6.2.2. Lokale Gedrängtheitszunahme unter Stresszunahme	120
6.2.3. Modellbildung - Osmolarität und FRET-Effizienz	122
6.3. Diskussion	124
6.3.1. Intrazelluläre Unterschiede der Gedrängtheit	124
6.3.2. Lokale Auswirkung der Osmolaritätsunterschiede	126
6.3.3. Zusammenhang der Osmolarität und der FRET-Effizienz	127
 III. Invertierte Lichtblattmikroskopie und Rauschanalyse: Konzept eines neuen Mikroskops	 129
Motivation und Zielsetzung	131
7. Idee und Umsetzung	134
7.1. Weitfeldfluoreszenzmikroskopie	134
7.2. Transport- und Kommunikationsmessung	135
7.3. Aufbau und Konstruktion des Mikroskops	137
7.4. Komponenten	137
7.4.1. Akustooptischer Deflektor	139
7.4.2. Laser	140
7.4.3. Galvanometer-Scanner	140
7.4.4. Objektiv	140
7.4.5. Mikroskopietisch	141
7.4.6. Photomultiplier	141
7.4.7. Kamera	141
7.5. Strahlführung im Anregungs- und Detektionspfad	142
7.5.1. Berechnung der Strahlführung	143
7.5.2. Punkt- und Lichtblattanregung	143
7.5.3. Detektion der Fluoreszenz über PMT und Kamera	148
8. Charakterisierung und erste Anwendung	151
8.1. Theoretisches Auflösungsvermögen	151
8.1.1. Anregungsfunktion - Laterale Auflösung	152
8.1.2. Detektionsfunktion - Axiale Auflösung	156
8.2. Methoden, Anwendungen und Resultate	160
8.2.1. Kreuzkorrelationen aus Eindetektor-Aufnahmen	160

8.2.2. Bildgebung (<i>imaging</i>)	162
IV. Zusammenfassung und Ausblick	167
9. Wesentliche Ergebnisse und zukünftige Projekte	169
9.1. Viskositätssensitiver Stresssensor - DASPMI	169
9.2. Redoxsensitiver Stresssensor - CellRox-DeepRed	170
9.3. Crowding-Sensor - fCrH2	171
9.4. Invertierte Lichtblattmikroskopie und Rauschanalyse	171
V. Appendix	175
VI. Register	181
Literaturverzeichnis	183
Abbildungsverzeichnis	196
Tabellenverzeichnis	198
Abkürzungsverzeichnis	200
Physikalische Größen	203

Vorwort und Aufbau der Arbeit

*Was das Leben ist und was es ausmacht sind Fragen,
die wir vielleicht nie werden vollständig klären können.
Aus persönlicher wissenschaftlicher Sicht ist es jedoch
unbefriedigend es dabei bewenden zu lassen, der
Neugier den Rücken zu kehren.*

Die grundlegendste Aussage, die sich über das Leben an sich treffen lässt, ist, dass es weit entfernt vom thermodynamischen Gleichgewicht stattfindet. Genauer gesagt ist es ein ständiges „Ringens um Entropie“, wie es Schrödinger in seinem Buch „Was ist Leben“ bereits im Jahre 1944 beschrieb. An diesem „Ringens um Entropie“ sind mannigfache zelluläre Prozesse wie die Proteinsynthese, die Sicherstellung räumlich spezifischer Energieversorgung, Entsorgung von Schadstoffen und die Koordination der Zellteilung beteiligt, um nur einige Wenige zu nennen. Im Allgemeinen werden diese Mechanismen unter den Sammelbegriffen der Homöostase und der Proliferation zusammengefasst^{[2] [3] [4]}. Da diese Prozesse oder deren Äußerungen oftmals physikalisch messbar sind, befasst sich die Biophysik im Allgemeinen mit dem Quantifizieren physikalischer Observablen biologischer Proben. Einige, in diesem Zusammenhang messbaren Größen, sind die Art und Geschwindigkeit zellulärer Proteindynamik, Systematik der Nahrungssuche und des Wachstums von Zellen, Adaptation an externe Stressoren und intrazelluläre Reaktionskinetiken. Die besondere Herausforderung, quantitative Aussagen über ein sich ständig veränderndes System zu treffen, liegt dabei in der Interpretation der Resultate, da die Zeitskala, auf der zelluläre Veränderungen ablaufen, von wenigen Mikrosekunden bis mehreren Stunden reicht, und immer nur ein Bruchteil der Gesamtdynamik betrachtet werden kann.

Das am Lehrstuhl begonnene Projekt „*Life - the art of noise?*“ hat sich zum Ziel gesetzt, einen Ordnungsparameter für die Lebendigkeit (*aliveness*) von Zellen zu finden - die Frage nach dem Leben an sich auf die Frage nach dem Lebensbeginn und dem Lebensende von Einzellern einzuschränken. Das Vorhaben geht auf die Überlegung zurück, dass der Übergang zwischen Leben und Tod kein sprunghafter Zustandswechsel ist, sondern ein kontinuierlicher Prozess, dessen Zwischenzustände und raumzeitliche Veränderungen messbar sein sollten. Um dieses Vorhaben umzusetzen, ist es notwendig, die Observablen, die diese universelle Größe - das Leben eines Einzellers - definieren,

ausfindig zu machen und geeignete Sensoren zur Wiedergabe ausgewählter zellulärer Parameter zu finden.

Für die zelluläre Analyse sind bereits einige Messmethoden entwickelt worden, die auf der Dynamik der Fluoreszenzintensität aufbauen. Einige populäre Beispiele sind FCS (*fluorescence correlation spectroscopy*)^[5] und FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*)^{[6][7][8]}, die Rückschlüsse von der zeitabhängigen Intensität der Fluoreszenz auf zelluläre Prozesse wie die Proteindynamik oder Reaktionskinetiken zulassen. Auch die fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung zellulärer Strukturen wie des endoplasmatischen Retikulums^{[9][10][11]} oder des mitochondrialen Netzwerks^[12] ist von Interesse, um topologische und zelltypische Gesetzmäßigkeiten und pathologische Zustandsänderungen aufzudecken. Populäre Mikroskopiemethoden, die auf der Intensität der Fluoreszenz beruhen und die Bildgebung lebender Zellen erlauben, sind SPIM (*single plane illumination microscopy*)^[13] und STED (*stimulated emission depletion microscopy*)^[14], wobei letztere Messmethode zu den höchstauflösenden Mikroskopietechniken gezählt wird und im Jahre 2014 mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt wurde.

Neben der Intensität ist die Lebenszeit der Fluoreszenz eine weitere physikalische Observable, deren Dynamik durch verschiedene Sensortypen ausgenutzt werden kann und Rückschlüsse auf zelluläre Zustände und Zustandsänderungen erlaubt. Das Prinzip dieser Sensoren ist eine spezifische Reaktion auf die zellulär lokale Umgebung, die eine charakteristische photophysikalische Veränderung der Sensoren bewirkt. Photophysikalische Zustände und deren Veränderungen sind damit indirekte Messgrößen biologischer Observablen und erfordern im Allgemeinen die biophysikalische Eichung mit Hilfe verschiedener Modelle, um die kausale Verknüpfung zwischen Biologie und Physik herzustellen.

Die meisten physikalischen Messmethoden, die erfolgreich zur Analyse biologischer Proben verwendet werden, sind in modernen kommerziellen Mikroskopen implementiert und optimiert. Diese Methoden beschränken sich aber im Allgemeinen auf lokal begrenzte Messungen der Fluoreszenzintensität und -lebenszeit. Eine besonders innovative Messmethode mit dem Potential, raumzeitliche Kommunikation auf kurzen Zeitskalen zu quantifizieren, ist jedoch mit keinem derzeit erhältlichen kommerziellen Mikroskop möglich. Aus diesem Grund ist es nötig, einen optischen Aufbau zu konzeptionieren, der diese vielversprechende Messmethode und die Erforschung zellulärer Kommunikation ermöglicht. Es folgt ein kurzer Überblick über die Themen dieser Arbeit.

Zunächst werden in Teil I elementare biologische und physikalische Grundlagen im Bezug zu dieser Arbeit vorgestellt. Die biologischen Grundlagen behandeln den Aufbau typischer eukaryotischer Zellen, die physikalischen die Photophysik von Fluorophoren und die Fluoreszenzmikroskopie. Im Anschluss wird auf allgemeine Zellkulturmethoden und -materialien eingegangen, und die verwendeten molekularen Sensoren im Hinblick auf ihre Wechselwirkung mit der zellulären Umgebung diskutiert. Die verwendeten Messmethoden, die Auswertung der Datensätze, die Fehlerrechnung, die Diskussion

allgemeiner Fehlereinflüsse und Signifikanztests schließen die Einleitung ab.

Teil II dieser Arbeit befasst sich mit der Analyse zellulärer Fluide unter physiologischen Bedingungen und Stresskonditionen und dem Vergleich beider. Dabei werden verschiedene Aspekte zellulärer Reaktionen auf *in vivo*-Stress im Besonderen über die Fluoreszenzlebenszeit des jeweiligen Sensors untersucht. Zur Untersuchung zellulärer Fluide stehen drei verschiedene fluoreszente Sensortypen zur Verfügung: Ein viskositäts- und polaritätssensitiver molekularer Rotor, ein durch oxidative Reaktionen aktivierbarer Fluorophor und ein Sensor, dessen molekulare Klappdynamik durch die Gedrängtheit der Umgebung beeinflusst wird. Zunächst wird geprüft, ob der molekulare Rotor DASPMI (4-[4-(Dimethylamino)Styryl]-N-Methylpyridinium Iodide) verschiedene Stresskonditionen und intrazelluläre Viskositätsunterschiede zwischen Mitochondrien, dem Zytoplasma, dem Nukleus und den Nukleoli wiedergeben kann. Anschließend wird unter Zuhilfenahme der Auswertemethode Phasor in Verbindung mit DASPMI ein Algorithmus zur Zellkompartimentseparation vorgestellt^[15]. Der Farbstoff CellRox-DeepRed wird als nächstes auf seine Fähigkeit geprüft, den oxidativen Stresszustand der Zelle über seine Fluoreszenzlebenszeit wiederzugeben. Zuletzt wird im Kontext zellulärer Stressuntersuchungen mit Hilfe von Sensoren die Gedrängtheit (*Crowding*)^[16] intrazellulärer Fluide durch osmotischen Stress verändert und mittels des Sensors fCrH2 untersucht.

In Teil III wird ein neues Mikroskop vorgestellt, mit dem eine Reihe spektroskopischer Messverfahren wie FCS^[17], PCF (*pair correlation function*)^[18] und SOFI (*superresolution optical fluctuation imaging*)^{[19] [20] [21] [22]} für den Lehrstuhl zugänglich werden. Die Arbeiten im Rahmen des Projektes beinhalten die Planung, den Einkauf der benötigten Komponenten und die Vorjustage des Mikroskops. Der Aufbau und die Funktionsweise des Mikroskops werden beschrieben und das laterale und axiale Auflösungsvermögen mit Hilfe numerischer Berechnungen, der Strahlen- und Fourieroptik charakterisiert.

Abschließend werden in Teil IV die wesentlichen Ergebnisse der Arbeit zusammengefasst, zukünftige Projekte diskutiert und auf offene Fragen eingegangen.

In dieser Arbeit sind Randbemerkungen durch abgesetzte Textpassagen im vorliegenden Format gekennzeichnet. Sie haben die Funktion sowohl auf spätere Inhalte zu verweisen als auch zusätzliche Begleitinformationen zu vermitteln, unter anderem auch solche, die nicht explizit Thema der Arbeit sind.

Teil I.

Einleitung

In diesem Kapitel werden biologische und physikalische Grundlagen vorgestellt, die zum Verständnis der vorliegenden Arbeit notwendig sind. Hierzu zählen der elementare Aufbau eukaryotischer Zellen mit Bezug zu den durchgeführten Experimenten, die Photophysik von Fluorophoren, im Besonderen die Fluoreszenz und Lebenszeit dieser sowie der strahlungslose intermolekulare Energietransfer. Die Beschreibung der Fluoreszenzmikroskopie als Methode zur Bildgebung fluoreszenter Moleküle, am historischen Beispiel eines Epifluoreszenzmikroskops und dessen Weiterentwicklung, dem Laser-Abtastmikroskop vervollständigt die Beschreibung der wesentlichen Grundlagen.

1.1. Die eukaryotische Zelle

Eukaryotische Zellen sind selbstorganisierende und replikationsfähige Organismen. Sie bestehen aus einer Vielzahl von Kompartimenten, die bis auf wenige Ausnahmen von Membranen umgeben sind. Diese Membranen definieren die Grenze der Kompartimente, deren Inhalt als Fluid aufgefasst werden kann. Das jeweilige kompartimentalisierte Fluid stellt eine komplexe Zusammensetzung vieler verschiedener Moleküle dar, die die Homöostase und Teilungsfähigkeit der Zelle gewährleisten. Diese Fluide haben charakteristische physikalische Auswirkungen auf die in dieser Arbeit verwendeten molekularen Sensoren. Für Informationen zur Molekularbiologie der Zelle, die über die Inhalte dieses Kapitels hinausgehen wird auf die einschlägige Fachliteratur^[4] verwiesen. Eine typische eukaryotische Zelle ist in Abb. 1.1 zu sehen.

Hier werden einige Bestandteile einer typischen eukaryotischen Zelle mit Bezug zu den durchgeführten Experimenten vorgestellt. In dieser Arbeit wurden für sämtliche Experimente HeLa (Henrietta Lacks - *human cervical carcinoma cells*)- und/oder U2OS (*human bone osteosarkoma epithelial cells*)-Zellen verwendet. Sofern eine regionspezifische Untersuchung der zellulären Fluide möglich ist, wird diese genannt und angegeben, in welchen Kapiteln diese auf ihre Reaktion auf *in vivo*-Stress geprüft werden. Die Auswahl der untersuchten Fluide erfolgt je nach räumlicher Anreicherung der Stresssensoren. Die Akkumulation und lokale Spezifität der Sensoren wird in Kapitel 2 erläutert.

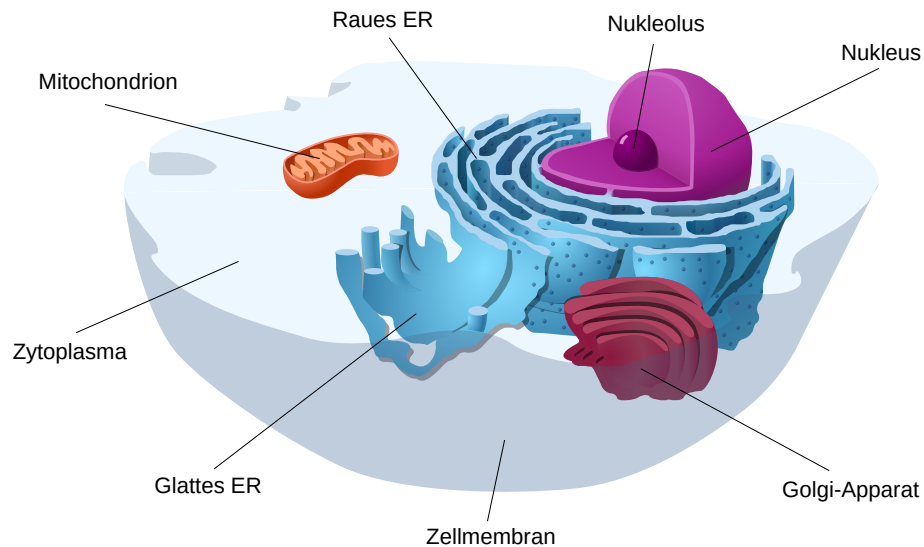


Abbildung 1.1.: Skizze einer typischen eukaryotischen Zelle. Gezeigt ist ein beispielhaftes Mitochondrion, der Nukleus (Zellkern), ein Nukleolus, das raue- und das glatte ER, der Golgi-Apparat, das Zytoplasma und die Zellmembran. Der Golgi-Apparat und das ER sind nicht Thema dieser Arbeit. Die typische Größe eukaryotischer Zellen bewegt sich zwischen $10\text{ }\mu\text{m}$ und $100\text{ }\mu\text{m}$ ^[4]. Die Abbildung wurde der Publikation^[23] entnommen und beschriftet.

Zytoplasma

Das Zytoplasma ist ein wässriges Gemisch aus vielen tausend unterschiedlichen Proteinen^[4], die unter anderem ihre Rolle als katalytische Moleküle einnehmen, verschiedenen Organellen wie dem Golgi-Apparat und den Mitochondrien, und dem Zytoskelett, das der Zelle Stabilität verleiht. Das Zytoplasma füllt den Zellinnenraum, hat die Konsistenz eines Gels^[24], ist ein dicht gedrängtes Fluid (*crowded*)^[25]^[26]^[27] und weist als Folge davon anomale Diffusion^[28] auf. Anomale Diffusion ist ein Spezialfall der brownischen Bewegung mit langreichweitigen Korrelationen und tritt in nicht-newtonschen Fluiden mit viskoelastischen Eigenschaften auf^[29]. Das Zytoplasma ist von einer selektiv permeablen Membran, der Zellmembran, umgeben. Es besteht zu 80–85 % aus Wasser und zu 10–15 % aus Proteinen. Der Rest besteht aus kleinen Mengen von DNA (*desoxyribonucleic acid*), RNA (*ribonucleic acid*), Lipiden, Polysacchariden sowie organischen und anorganischen Molekülen^[30]^[31].

In Kapitel 6 wird die selektive Permeabilität der Zellmembran genutzt, um durch den Effekt der Osmose [Kapitel 2.4] den Wassergehalt des Zytoplasmas zu verringern und damit die Gedrängtheit des zytoplasmischen Fluids zu erhöhen. Dort wird das Lebenszeitverhalten eines FRET (*Förster resonance energy transfer*)-Sensors unter iso- und hyperosmotischen Bedingungen mit Bezug auf das *Crowding* gemessen. In Kapitel 4 werden spezifische Reaktionen des molekularen Rotors DASPMI im Zytoplasma auf chemotherapeutischen und oxidativen Stress geprüft.

Mitochondrien

Mitochondrien stellen die Energieversorgung der Zelle über den Citratzyklus sicher. Sie bilden ein topologisch dynamisches und tubuläres Netzwerk im Zytoplasma^{[32] [33]}, das dem räumlichen Energiebedarf der Zelle angepasst ist^{[4] [34]}. Auf ihrer im Inneren gefalteten Oberfläche, der inneren mitochondrialen Membran, wird durch die ATP (*adenosine triphosphate*)-Synthase im Rahmen der Atmungskette ADP (*adenosine diphosphate*) zu ATP phosphoryliert. Als Nebenprodukt der Atmungskette werden freie Sauerstoffradikale [ROS (*reactive oxygen species*)] in den Mitochondrien gebildet^[35]. Die Mitochondrien werden durch die äußere mitochondriale Membran vom Zytoplasma getrennt und spielen eine bedeutende Rolle im Alterungsprozess^{[36] [37]}, der seit Jahren im Fokus der Forschung steht.

In Kapitel 5 wird CellRox-DeepRed, ein durch ROS aktivierbarer Sensor, zum Nachweis oxidativen Stresses in den Mitochondrien verwendet. In Kapitel 4 wird mit Hilfe von DASPMI die Wirkung von chemotherapeutischem und oxidativem Stress auf die Mitochondrien untersucht.

Nukleus

Der Nukleus, auch Zellkern genannt, enthält das Nukleoplasma, das hauptsächlich aus Chromatin und RNA besteht. Im Nukleoplasma wird im Rahmen der Interphase die DNA repliziert^[38]. In der Nukleusmembran befinden sich die Kernporen, die den Kommunikationsweg zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma darstellen. Dieser Austausch zwischen Nukleoplasma und Zytoplasma wurde von Gratton et al.^[39] mit Hilfe der Messmethode PCF nachgewiesen.

Die Reaktion des Zellkerns auf oxidativen Stress und das Chemotherapeutikum Cisplatin wird in Kapitel 4 anhand von vorliegenden FLIM (*fluorescence lifetime imaging microscopy*)-Messungen an HeLa-Zellen mit der Phasor-Methode untersucht. Des Weiteren widmet sich Kapitel 6 der Untersuchung der Gedrängtheit und der Änderung dieser Größe mit Hilfe des FRET-Sensors fCrH2. In Teil III wird ein neues Mikroskop vorgestellt, mit dessen Hilfe die Kommunikation zwischen Nukleoplasma und Zytoplasma quantifiziert werden kann und welches die hierfür benötigte Methode PCF auf effiziente Weise möglich macht.

Nukleoli

Nukleoli, auch Kernkörperchen genannt, beinhalten hauptsächlich RNA und spezifische Proteine und besitzen keine eigene Membran. Sie sind meist zentral im Nukleus zu finden und nehmen an der Produktion der Ribosomuntereinheiten teil^[40].

Die Reaktion der Kernkörperchen auf das Chemotherapeutikum Cisplatin wird in Kapitel 4 anhand von vorliegenden FLIM-Messungen mit der Phasor-Methode analysiert und diskutiert.

1.2. Photophysik und Fluorophore

Fluorophore sind Moleküle, die nach der Anregung durch eine Lichtquelle Fluoreszenzphotonen aussenden. Mit ihrer Hilfe können spezifische Regionen in Zellen mittels eines Fluoreszenzmikroskops [Kapitel 1.3.1] sichtbar gemacht werden. Zur zellulären Färbung stehen drei Möglichkeiten zur Verfügung: Ein immunmarkierter Farbstoff wird in die Zelle eingebracht, der spezifisch an bestimmten Strukturen andockt [IHC (*immunohistochemistry*)], die Zelle wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff behandelt (*labeling*), oder ein bestimmter DNA-Vektor wird eingeschleust, der die Zelle dazu veranlasst, ein fluoreszentes Protein zu synthetisieren. Letztere Methode stellt die sogenannte transiente Transfektion dar.

Zur Untersuchung der Sensoren stehen zwei wesentliche Observablen zur Verfügung: Die Intensität (*fluorescence intensity*), die von der Anzahl der pro Zeiteinheit abgegebenen Photonen in einem bestimmten Wellenlängenbereich abhängt und die Lebenszeit (*fluorescence lifetime*), die angibt, wie lange ein Molekül im angeregten Zustand verbleibt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind DASPMI und CellRox-DeepRed. Der FRET-Sensor fCrH2 ist ein transfizierbarer Vektor.

1.2.1. Fluoreszenz

Fluoreszenz ist ein elektronischer Relaxationsprozess eines Moleküls im angeregten Zustand, der unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons erfolgt. Die wesentlichen Anregungszustände eines Fluorophors sind in Abb. 1.2 gezeigt. Neben den elektronischen anregbaren Zuständen gibt es noch rotatorische und vibronische Zustände, in welche sowohl die Anregung wie auch die strahlungslose Relaxation eines Moleküls erfolgen kann^[41].

Der elektronische Übergang vom ersten angeregten Zustand S_1 in den Grundzustand S_0 wird Fluoreszenz genannt. Nach der Belichtung mit einem Laser befindet sich der Fluorophor in einem elektronisch, vibronisch und rotatorisch angeregten Zustand. Fluorophore werden in der Regel nicht in den S_1 Zustand angeregt, sondern in einen vibronischen Zustand des ersten elektronisch angeregten Zustands. Diese Gesetzmäßigkeit wird durch das Franck-Condon-Prinzip^[42] beschrieben. Nach der Anregung in einen vibronischen und rotatorischen Zustand des S_1 Niveaus kann der Fluorophor über IC (*internal conversion*) strahlungslos in den S_1 Zustand relaxieren. Von dort hat er die Möglichkeit, entweder unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons in den S_0 Zustand zu relaxieren, oder mit sehr viel geringerer Wahrscheinlichkeit über ISC (*intersystem crossing*) in den Triplettzustand T_1 zu wechseln. Im Zustand T_1 verweilt das Molekül dunkel und relaxiert gewöhnlich über Phosphoreszenz in den Grundzustand S_0 . Die Rotverschiebung der Fluoreszenz, $\lambda_{\text{ex}} < \lambda_{\text{det}}$, wird Stokesverschiebung (*Stokes-shift*) genannt und ermöglicht die fluoreszenzmikroskopische Bildgebung^[43]. Abb. 1.3 zeigt das Absorptionsspektrum und das durch die Rotverschiebung entstandene Emissionsspektrum eines Fluorophors.

Jablonski-Diagramm

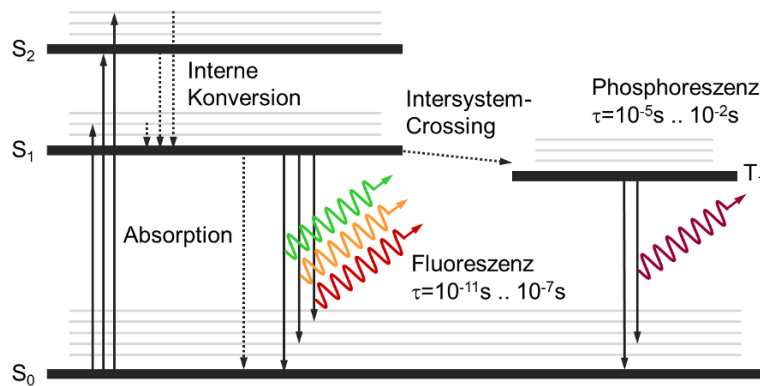


Abbildung 1.2.: Jablonski-Diagramm. Die Grafik zeigt die wesentlichen Anregungszustände eines Fluorophors. S_0 bezeichnet dabei den Grundzustand, S_1 den ersten elektronischen Anregungszustand und T_1 den Triplettzustand. Die grauen Linien oberhalb von S_0 , S_1 , S_2 und T_1 zeigen die Rotations- und Vibrationsniveaus des Fluorophors. Anregungen in höhere Energieniveaus als S_1 (elektronisch und/oder vibronisch/rotatorisch) relaxieren strahlungslos unter IC in den ersten angeregten Zustand S_1 . Von dort kann Fluoreszenz, $S_1 \rightarrow S_0$ oder ISC, $S_1 \rightarrow T_1$ erfolgen. Den Übergang $T_1 \rightarrow S_0$ nennt man Phosphoreszenz. Die Zeitskala der Fluoreszenz ist im Nanosekunden-Bereich, die der Phosphoreszenz im Sekunden-, Minuten- und Stundenbereich messbar. Durch rote, orange und grüne Wellenmuster ist symbolisch die Fluoreszenz, ausgehend von S_1 , bzw. die Phosphoreszenz, ausgehend von T_1 , in rotatorische und/oder vibronische Zustände gezeigt. Die Existenz der rotatorischen und vibronischen Energiezustände ist die Ursache für die Rotverschiebung der Fluoreszenz (*Stokes-shift*). Abbildung: LTB Lasertechnik Berlin^[44].

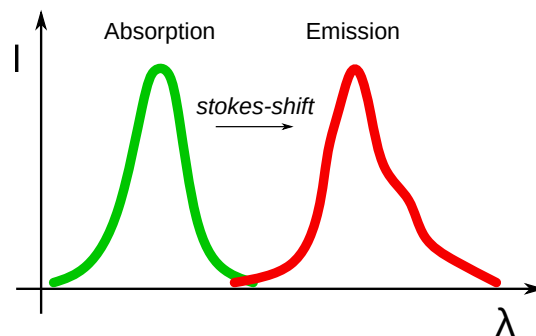


Abbildung 1.3.: Der Stokes-shift. Gezeigt ist die Rotverschiebung des Absorptionsspektrums eines Fluorophors. Das Emissionsspektrum (rot) tritt bei höheren Wellenlängen, also geringeren Energien, als die Absorption (grün) auf. Die Rotverschiebung kann als diejenige Energiedifferenz zwischen Anregung und Relaxation des Fluorophors verstanden werden, die durch strahlungslose Relaxationsprozesse gegeben ist. Der *Stokes-shift* erlaubt die Trennung der Emission und der Absorption durch wellenlängenspezifische Filter und schafft die Grundlage zur Fluoreszenzmikroskopie.

1.2.2. Die Lebenszeit der Fluoreszenz und Fluoreszenzlöschung

Neben der Intensität der Fluoreszenz ist die Lebenszeit der Fluoreszenz eine weitere wichtige Messgröße, welche die Abklingungszeit des fluoreszenten angeregten Zustands beschreibt. Die Lebenszeit der Fluoreszenz ist bei der Messmethode FLIM [Kapitel 3.1.1] die zentrale Auswertgröße. Der Vorteil bei der Lebenszeitmessung gegenüber der Intensitätsmessung ist eine geringere Fehleranfälligkeit gegenüber Streuungs- und Bleichprozessen^[45]^[46]. Die Lebenszeit eines Fluorophors ist eine robuste und universelle Größe, die fest mit der Photophysik der Farbstoffmoleküle und ihrer Interaktion mit der Umgebung verknüpft ist.

Die Lebenszeit der Fluoreszenz wurde bereits im Jahre 1919 von Stern und Volmer^[47] und im Jahre 1926 von Gaviola^[48] untersucht. Der Prozess, der hierbei zeitlich aufgelöst gemessen wird, ist der in Kapitel 1.2.1 beschriebene elektronische Übergang $S_1 \rightarrow S_0$ und ist im Nanosekundenbereich zu finden. Der Zerfall des angeregten elektronischen Zustands S_1 folgt der Gl. (1.1)^[46]. $N(\tau_A)$ bezeichnet dabei die Anzahl der Moleküle im angeregten Zustand in Abhängigkeit der Photonenankunftszeiten τ_A der Fluorophore.

$$\frac{d}{d\tau_A} N(\tau_A) = -(k_f + k_{nr})N(\tau_A), \quad N(\tau_A) = A \exp(-\tau_A/\tau) + B, \quad \tau = \frac{1}{k_f + k_{nr}} \quad (1.1)$$

Gl. (1.1) beschreibt die Verteilung der Photonenankunftszeiten eines Ensembles desselben Fluorophortyps. Die Zerfallskonstante τ ist die Lebenszeit des Fluorophors. In dieser Gleichung beschreibt k_f die Rate der Fluoreszenz und k_{nr} die Rate der strahlungslosen Prozesse, die vorzeitig zur Relaxation des Fluorophors führen.

Der Prozess, der die Lebenszeit von Fluorophoren verringern kann, wird Fluoreszenzlöschung (*quenching*)^[49] genannt. Hierbei wird die Energie eines Fluorophors auf Umgebungsmoleküle strahlungslos übertragen, k_{nr} in Gl. (1.1) steigt an und die Quantenausbeute Q_A des Donor-Moleküls sinkt^[50]. Die Quantenausbeute Q_A ist direkt proportional zur Lebenszeit τ . Die Gl. (1.2) zeigt diesen Zusammenhang mit der Quenching-Konstante k_{quant} .

$$Q_A = k_{\text{quant}}\tau \quad (1.2)$$

Es werden zwei Prozesse unterschieden, die zur Fluoreszenzlöschung führen: Die dynamische Fluoreszenzlöschung (*dynamic quenching*) bewirkt, dass die Lebenszeit des Donormoleküls während eines Stoßes mit einem Akzeptormolekül reduziert wird. Bei der statischen Fluoreszenzlöschung (*static quenching*) bindet der Fluorophor an Nachbarmoleküle. Dabei bleibt die Lebenszeit des Donormoleküls erhalten, es nimmt lediglich die Intensität der Fluoreszenz ab. Beide Prozesse können in Abhängigkeit von der Konzentration der Donor- und Akzeptormoleküle durch die Stern-Volmer-Gleichung^[50] beschrieben werden. Die strahlungslose Energieübertragung von einem Donor- zu einem Akzeptormolekül kann ebenfalls zur Verringerung der Fluoreszenzlebenszeit führen. Dieser Effekt wird FRET genannt, mit welchem sich der nächste Abschnitt befasst.

1.2.3. Förster Resonance Energy Transfer

FRET ist die strahlungslose Energieübertragung von einem angeregten Donor- zu einem Akzeptor-Fluorophor. Wenn zwei Fluorophore im Förster-Abstand $R_F = r$ zueinander stehen, beträgt die Effizienz dieser Energieübertragung $E_{\text{FRET}} = 50\%$. FRET ist ein abstandssensitiver Effekt und tritt bei Abständen zwischen Donor- und Akzeptormolekül im Bereich weniger Nanometer auf.

$$E_{\text{FRET}} = \frac{1}{1 + (r/R_F)^6} \quad (1.3)$$

In Gl. (1.3) ist r der Abstand der Moleküle voneinander und R_F der Försterradius. Der Försterradius R_F ist abhängig vom Überlapp des Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors, der Orientierung beider Moleküle zueinander, der Quantenausbeute des Donors und dem Brechungsindex des Mediums in dem der Sensor beobachtet wird. R_F wird im Allgemeinen berechnet^[51].

Gl. (1.3) kann mit Hilfe Fermis goldener Regel^[52] hergeleitet werden, wenn man die Fluorophore als Dipole idealisiert. Als Hamiltonoperator wird hierbei der Dipol-Dipol-Wechselwirkungsoperator und als Näherung für die Zustandsdichte das Überlappintegral des Donor-Emissionsspektrums und des Akzeptor-Absorptionsspektrums verwendet.

Es gibt zwei Mess- und Auswertemethoden, um FRET-Effizienzen $[E_{\text{FRET}}]$ zu messen und zu quantifizieren: SE-FRET (*sensitized emission-FRET*) und LT-FRET (*lifetime-FRET*)^[51]. LT-FRET nutzt das Prinzip der resonanten Energieübertragung von Donor zu Akzeptor und der damit einhergehenden Veränderung der Lebenszeiten dieser. SE-FRET verwendet dagegen das Verhältnis der Emissionsintensität des Donors und des Akzeptors, um auf FRET-Effizienzen zu schließen. In dieser Arbeit wird nur LT-FRET verwendet.

1.3. Fluoreszenzmikroskopie

In diesem Abschnitt wird das Epifluoreszenzmikroskop als historisch erstes Fluoreszenzmikroskop ohne zusätzliche Tiefendiskriminierung und dessen Weiterentwicklung, das Laser-Abtastmikroskop [LSM (*laser scanning microscope*)], vorgestellt. Ein kommerzielles LSM ist das Leica-TCS-SP5, das für alle Experimente dieser Arbeit verwendet wurde. Beide Mikroskoparten werden in der invertierten Bauweise beschrieben.

Fluoreszenzmikroskope nutzen die Rotverschiebung der Fluoreszenz für die Bildgebung. Das wesentliche Element eines solchen Mikroskops ist der dichroitische Filter, der einen bestimmten Wellenlängenbereich reflektiert und einen anderen transmittiert. Zur Bildgebung fluoreszenter Moleküle kann man zwei Mikroskoparten unterscheiden: Die konfokalen Mikroskope wie LSM^[53] und *Spinning-Disc*^[54], die entweder eine, oder eine von Vielzahl Lochblenden für die Tiefendiskriminierung der Probe nutzen auf der einen, und einfache Epifluoreszenzmikroskope^[55] ohne zusätzliche Tiefendiskriminierung auf der anderen Seite. Die Tiefendiskriminierung in der Fluoreszenzmikroskopie

sorgt dafür, dass nur eine dünne Schicht der angeregten Fluoreszenz detektiert wird. Mit ihrer Hilfe lassen sich Schnitte fluoreszierender Proben aufnehmen, die später zu einem dreidimensionalen Bild zusammengesetzt werden können.

1.3.1. Epifluoreszenzmikroskopie

Bei einem Epifluoreszenzmikroskop [Abb. 1.4] wird im Allgemeinen eine Quecksilberdampflampe als Lichtquelle verwendet, da deren Licht spektral vom ultravioletten bis zum infraroten Wellenlängenbereich reicht^[56] und damit die meisten Fluorophore angeregt werden können.

Im ersten Schritt wird mit Hilfe einer Blende aus dem sphärisch abgestrahltem Licht ein paralleles Lichtbündel selektiert, und über einen spektralen Bandpassfilter der fluorophorspezifische Anregungswellenlängenbereich ausgewählt.

Da in dem durch die Lochblende selektierten Strahlbündel auch nichtparallele Strahlen enthalten sind, wird das Bündel mit Hilfe einer weiteren, viel kleineren Lochblende (*pinhole*) gereinigt. Das Prinzip hierbei ist, dass nur solche Strahlen, die parallel auf eine Linse treffen, im Fokusabstand der Linse fokussiert werden. Bei der sphärischen Abstrahlung der Quecksilberdampflampe enthält das Strahlbündel also auch divergente Strahlen, die beim Fokussieren nicht die Lochblende passieren können.

Der Strahl wird hinter der Lochblende wieder aufgeweitet und auf einen dichroitischen Spiegel gelenkt, der das Anregungslicht in das Objektiv reflektiert. Jeder angeregte Fluorophor sendet Fluoreszenzphotonen aus, die, abhängig von ihrer Position in der Probenebene, unter einem gegenüber der optischen Achse gekippten Winkel das Objektiv verlassen. Die Fluoreszenzstrahlen werden vom Dichroiten transmittiert und von einer Linse auf einen Kamerasensor fokussiert. Damit wird jeder Ort aus der angeregten Probenebene auf einen individuellen Ort auf dem Kamerasensor abgebildet.

Die Bildgebung erfolgt beim Epifluoreszenzmikroskop ohne bewegliche Teile. Im Detektionsstrahlengang können weitere Optiken angebracht werden, die den Strahlversatz lateral zur optischen Achse und damit die Vergrößerung des Mikroskops erhöhen. Bei einem Epifluoreszenzmikroskop wird die gesamte Probe gleichzeitig beleuchtet.

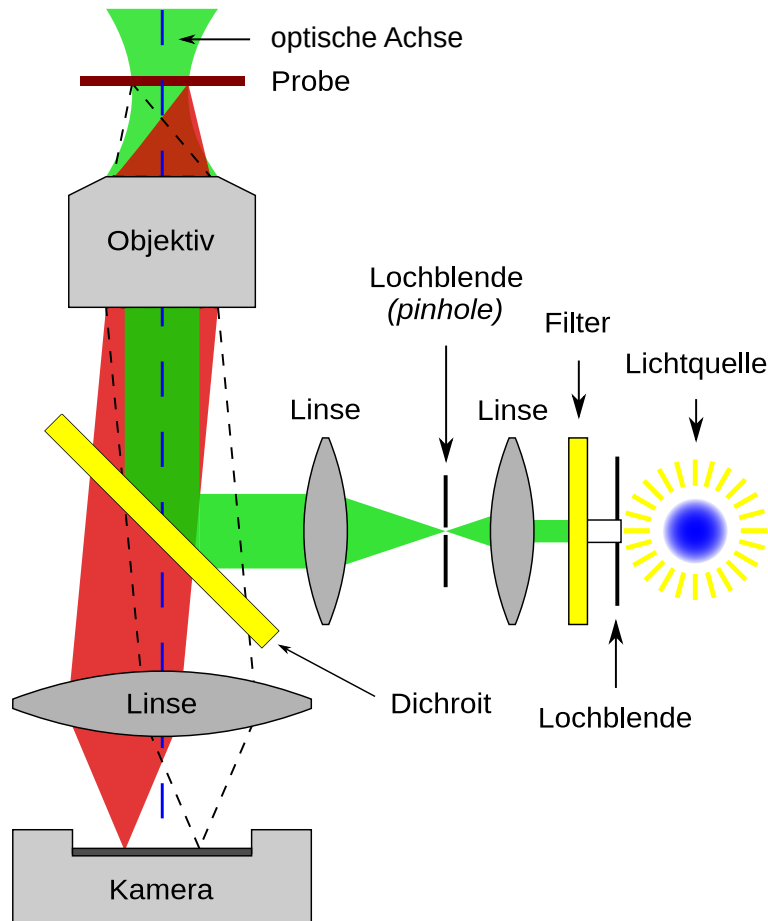


Abbildung 1.4.: Skizze eines invertierten Epifluoreszenzmikroskops. Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines invertierten Epifluoreszenzmikroskops. Bei einem invertierten Mikroskop erfolgt die Anregung und die Detektion der Fluoreszenz in entgegengesetzter Richtung. Grün ist der Anregungsstrahlengang, rot der Detektionsstrahlengang gezeigt. Die **Lochblende** nach der Lichtquelle filtert aus dem abgestrahltem Licht der Quelle ein schmales Strahlbündel. Das durch den **Filter** gelenkte Licht wird spektral auf den Anregungswellenlängenbereich des jeweiligen Fluorophors begrenzt und auf eine **Lochblende (pinhole)** fokussiert. Die **Linse** parallelisiert anschließend den Anregungsstrahl, der über den **Dichroiten** reflektiert und in das **Objektiv** gelenkt wird. Das Objektiv fokussiert den Anregungsstrahl auf die **Probe** und regt dort Fluorophore an. Jeder Fluorophor emittiert abhängig von seiner Position in der Probenebene Fluoreszenzphotonen, die unter entsprechend gekippten Winkeln als parallelisierte Strahlen das Objektiv verlassen. Der Fluoreszenzstrahl wird vom Dichroiten transmittiert und über eine Linse auf den Sensor der **Kamera** fokussiert. Der gestrichelte Detektionspfad zeigt die Abbildung eines anderen Punktes auf den Kamerasensor.

1.3.2. Laserabtastmikroskopie

Bei der Laserabtastmikroskopie [LSM, Abb. 1.6] wird als Lichtquelle ein Laser verwendet. Dieser sendet einen monochromatischen, kohärenten Strahl aus, der direkt ohne Strahlreinigung verwendet werden kann. Der Laserstrahl wird von einem Dichroiten reflektiert und auf ein System aus zwei orthogonalen Galvanometern gelenkt. Nach einer Strahlaufweitung wird die hintere Objektivapertur beleuchtet und ein beugungsbegrenzter Fokus mit dem Radius d_0^{ray} in der Probenebene erzeugt:

$$d_0^{\text{ray}} = \frac{0.61\lambda_{\text{ex}}}{\text{NA}}. \quad (1.4)$$

In Gl. (1.4) ist λ_{ex} die Wellenlänge des Lasers und NA die numerische Apertur des Objektivs. Über das senkrecht zueinander gekoppelte System der Galvanometer kann der Eintrittswinkel in das Objektiv und damit der Fokus in der Probenebene variiert werden.

Während des Abtastvorgangs wird die Position der Galvanometer mit Bezug zur Messzeit registriert. Die Fluoreszenz nimmt den rückwärtigen Weg bis zum Dichroiten (*descanning*), der das Fluoreszenzlicht transmittiert. Der Strahl wird anschließend auf eine Lochblende (*pinhole*) fokussiert, die nur Licht aus der Fokusebene durchlässt und damit für die Tiefendiskriminierung der Probe [Abb. 1.5] sorgt. Dies ist nötig, da die Detektion der Fluoreszenz in gegensätzlicher Richtung zur Anregung erfolgt. Ein Mikroskop, bei dem die Detektion senkrecht zur Anregung erfolgt, wird SPIM^[13] genannt. Fluoreszenz oberhalb der Probenebene wird vor die Lochblende und Fluoreszenz unterhalb der Probenebene hinter die Lochblende fokussiert und damit bei der Detektion geblockt. Anschließend wird der detektierte Fluoreszenzstrahl auf eine APD (*avalanche photo diode*) oder SPAD (*single photon avalanche diode*) fokussiert. Das zeitlich aufgelöste Fluoreszenzsignal wird im Anschluss mit der Galvanometerposition verknüpft. Auf diese Weise lassen sich einzelne Ebenen der Probe als Fluoreszenzbilder aus dem zeitkontinuierlichen Fluoreszenzsignal rekonstruieren. Verfährt man die Probe in der Höhe, so lässt sich durch die wiederholte Abtastung eine dreidimensionale Aufnahme der Probe anfertigen.

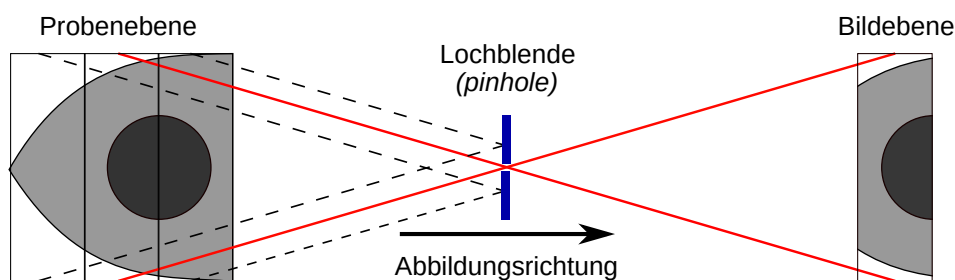


Abbildung 1.5.: Funktionsweise einer Lochblende zur Tiefendiskriminierung. Gezeigt ist die schichtselektive Abbildung einer Ebene nach der vollständigen Abtastung. Strahlen, die aus anderen als der zentralen Ebene emittiert werden, werden durch die Lochblende abgeblockt. **Rot** sind Strahlen gezeigt, die aus der zentralen Fokusebene stammen. So entsteht die Tiefendiskriminierung der Probe, auch „*optical sectioning*“ genannt.

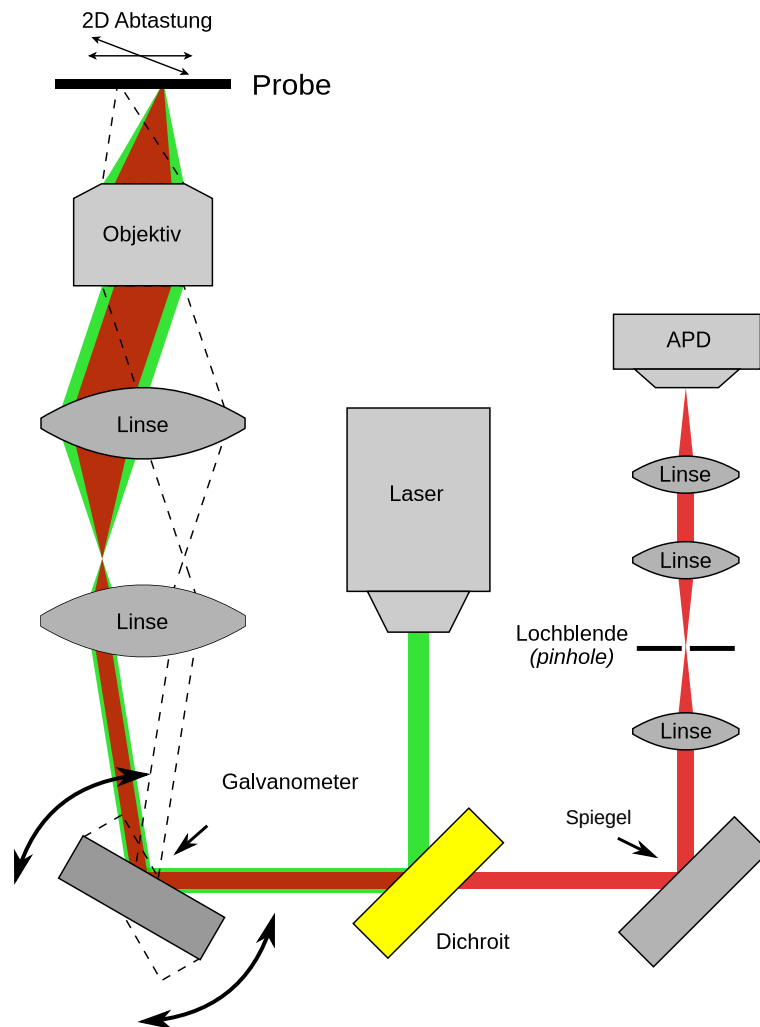


Abbildung 1.6.: Skizze eines invertierten Laser-Abtastmikroskops (LSM). Bei einem invertierten Mikroskop erfolgt die Anregung und die Detektion der Fluoreszenz in entgegengesetzter Richtung. Grün ist der Anregungsstrahlengang, rot der Detektionsstrahlengang gezeigt. Als Lichtquelle wird bei einem LSM ein **Laser** verwendet. Der Laserstrahl wird über den wellenlängenselektiv reflektierenden **Dichroiten** auf den **Galvanometer**-Spiegel gelenkt. Anschließend wird der Anregungsstrahl über einen Teleskopaufbau, bestehend aus zwei **Linse**n, aufgeweitet und auf die hintere Aperturebene des **Objektivs** parallelisiert. Der Galvanometer kann elektronisch gesteuert den Anregungsstrahl unter verschiedenen Winkeln in das Objektiv lenken. In der Abbildung ist nur ein Galvanometer für die Ablenkung in x -Richtung eingezeichnet. In einem LSM wird ein weiterer Galvanometer mit orthogonaler Rotationsachse verwendet, um den in x -Richtung abgelenkten Strahl zusätzlich in y -Richtung abzulenken. Über diese elektronisch gesteuerte Ablenkung wird die Probenebene zweidimensional abgetastet. Das beleuchtete Volumen ist im Falle eines LSM im Gegensatz zum Epifluoreszenzmikroskop [Abb. 1.4] beugungsbegrenzt und damit wesentlich kleiner. Der Fluoreszenzstrahl nimmt den rückwärtigen Weg bis zum Dichroit, der Fluoreszenzwellenlängen transmittiert. Eine Linse fokussiert den Detektionsstrahl auf eine **Lochblende (pinhole)**, die für die Tiefendiskriminierung der Fluoreszenz verantwortlich ist. Das zeitkontinuierliche Fluoreszenzsignal wird mit Hilfe eines **APD** oder **SPAD** detektiert.

Materialien und Observablen

In diesem Kapitel werden sensorspezifische biologisch-physikalische Observablen und zugrundeliegende zelluläre Mechanismen vorgestellt, die in dieser Arbeit gemessen wurden. Viskosität und Polarität der zellulären Umgebung beeinflussen den molekularen Rotor DASPMI. Der oxidative Stresszustand zellulärer Fluide kann über den oxidierbaren Fluorophor CellRox-DeepRed nachgewiesen werden. Auf osmotische Veränderungen in zellulären Fluiden reagiert der Sensor fCrH2, der FRET als Funktionsprinzip verwendet. Des Weiteren wird auf die jeweilige zelluläre Lokalisation der Sensoren eingegangen und allgemeine Zellkulturarbeiten werden beschrieben.

2.1. Zellkultur

In diesem Abschnitt wird die allgemeine Behandlung der HeLa- und U2OS-Zellen bis zum Aussäen dieser in Mikroskopiekammern (*wells*), wie auch die verwendeten Zellkulturmaterialien beschrieben. Die individuelle projektbezogene Färbung oder Transfektion, wie auch Stressbehandlungen der Zellen sind den jeweiligen Kapiteln zu entnehmen.

Zellkulturmaterialien

PBS (*phosphate buffered saline*) (Gibco - Thermo Fischer) zum Waschen der Zellen, DMSO (*dimethyl sulfoxide*) (Gibco - Thermo Fischer) - Lösungsmittel für Menadion. McCoy (Merck - Sigma Aldrich) - Zellnährmedium für U2OS-Zellen, DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*) (Gibco - Thermo Fischer) - Zellnährmedium für HeLa-Zellen. FKS (*fetales Kälberserum*) (Thermo Fischer), Natriumpyruvat (Thermo Fischer), L-Glutamin (Thermo Fischer) und Penicillin/Streptomycin (Thermo Fischer) sind Zusätze für das DMEM-Medium. FuGene6 (Promega) wurde als Transfektionsreagenz verwendet. OptiMem (Gibco - Thermo Fischer) - Kulturmedium ohne FKS und ohne Penicillin/Streptomycin zur Vorbereitung von Transfektionen. Für die Vorbereitung der Transfektionsvektoren wurden Mikroreaktionsgefäße der Firma Eppendorf verwendet. HeLa- und U2OS-Zellen wurden in Zellkulturflaschen (Thermo Fischer) kultiviert.

Vorbereitung der Zellnährmedien

Das Kulturmedium McCoy für U2OS-Zellen ist unverändert als Zellnährmedium nutzbar, auf 500 ml DMEM wird 50 ml FKS, 5 ml Natriumpyruvat, 5 ml L-Glutamin und 5 ml Penicillin/Streptomycin gegeben.

Kultivierung der Zellen

HeLa- und U2OS-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit den jeweiligen Kulturmedien, DMEM für HeLa-Zellen oder McCoy für U2OS-Zellen, bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und bei 80 %-iger Konfluenz passagiert und in Mikroskopiekammern ausgesät.

Mikroskopie und Mikroskopiemedium

Als Mikroskopiemedium wird in dieser Arbeit das Kulturmedium DMEM ohne pH-Indikator Phenolrot mit 5 % HEPES (*4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)*) bezeichnet. Dieses transparente Medium wird sowohl für die Mikroskopie der HeLa- wie auch der U2OS-Zellen verwendet. Vor der Mikroskopie der Zellen wird das Kulturmedium gegen Mikroskopiemedium getauscht. Als Mikroskopiekammern wurden 4-well Probenkammern der Firma ibidi verwendet.

2.2. Molekularer Rotor - Viskosität

Molekulare Rotoren sind Fluorophore, deren Anregungs- und Relaxationsverhalten durch ihre unmittelbare Umgebung beeinflusst werden. Sie verfügen über mindestens einen molekulinternen Rotationsfreiheitsgrad, der sie als molekularen Rotor klassifiziert. Abb. 2.1 zeigt die Strukturformel des verwendeten molekularen Rotors DASPMI.

DASPMI hat die Eigenschaft, seine Fluoreszenzintensität und mittlere Lebenszeit $\langle\tau\rangle$ mit steigender Mikroviskosität der Umgebung zu erhöhen^{[57] [58]}. Diese Eigenschaft geht mit dem Rückgang der Rotationsdiffusion in viskoserer Medien einher. Dementsprechend werden molekulare Rotoren als Viskositätssensoren eingesetzt. Weiterhin bekannt ist, dass DASPMI auf eine Polaritätserhöhung des Umgebungsfluids mit einer Verringerung seiner mittleren Lebenszeit $\langle\tau\rangle$ reagiert. Diese Eigenschaft ermöglichte Ramadass et al.^[59] die Messung des mitochondrialen Membranpotentials.

Generell ist die Relaxation $S_1 \rightarrow S_0$ von DASPMI sehr komplex und muss in Wechselwirkung mit der lokalen Umgebung betrachtet werden. Eine quantenmechanische Beschreibung der Relaxationskinetik von DASPMI wird in der Publikation von Aschi et al.^[60] hergeleitet. DASPMI hat drei Rotationsfreiheitsgrade ξ_1 , ξ_2 und ξ_3 , von denen einer, ξ_1 , bei Raumtemperatur nicht anregbar ist. Man kann drei Anregungszustände unterscheiden, die mit verschiedenen Winkelstellungen der Rotationsfreiheitsgrade ξ_2 und ξ_3 assoziiert sind und für das Auftreten dreier verschiedener Lebenszeiten

τ_1 , τ_2 und τ_3 verantwortlich sind^[61]: LES (*locally excited state*), ICTS (*intramolecular charge transfer state*) und TICTS (*twisted intramolecular charge transfer state*). Die Relaxationszeit des LES liegt unterhalb der Zeitauflösung des verwendeten TCSPC (*time correlated single photon counting*)-Systems, im Pikosekunden-Bereich. Für die Relaxationszeiten der ICTS und TICTS gilt Gl. (2.1), wobei beide Lebenszeiten im Nanosekunden-Bereich liegen und damit gut messbar sind.

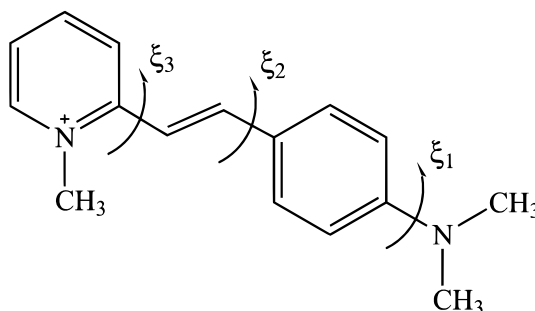


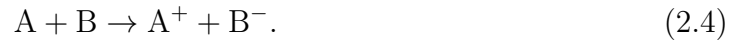
Abbildung 2.1.: Strukturformel: DASPMI-Molekül. Gezeigt sind die Rotationsfreiheitsgrade ξ_1 , ξ_2 und ξ_3 des Moleküls, die DASPMI als molekularen Rotor klassifizieren. Von diesen dreien ist ξ_1 bei Raumtemperatur nicht anregbar. Abhängig von den Winkelstellungen der anderen beiden Freiheitsgrade können drei verschiedene Lebenszeiten τ_1 , τ_2 und τ_3 auftreten, von denen eine, τ_1 , im Pikosekunden-Bereich, und damit unterhalb des Auflösungsvermögens des verwendeten TCSPC-Aufbaus ist. τ_1 wird mit dem LES, τ_2 mit dem ICTS und τ_3 mit dem TICTS Anregungszustand assoziiert. Die Abmessungen des DASPMI-Moleküls sind etwa $0.5 \text{ nm} \times 1 \text{ nm}$. Abbildung übernommen aus der Publikation von Aschi et al.^[60].

$$\tau_{\text{ICTS}} < \tau_{\text{TICTS}} \quad (2.1)$$

In Kapitel 4 dieser Arbeit wird DASPMI in HeLa-Zellen zur Entwicklung eines Separationsalgorithmus mit Hilfe der Phasordarstellung verwendet. Zusätzlich wird die regions- und behandlungsspezifische Reaktion von DASPMI auf zelluläre Stresszustände untersucht. Der Sensor ist ein hydrophiler Farbstoff, der im gesamten Zellinnenraum beobachtet werden kann.

2.3. Redox-Sensor - oxidativer Stress

Chemische Reaktionen, bei denen Elektronen auf einen Reaktionspartner übertragen werden, heißen Redox-Reaktionen. Sie bestehen aus dem kombinierten Ablauf einer Oxidations- und einer Reduktionsreaktion. Das aus dem Alltag bekannteste Beispiel für eine Oxidationsreaktion ist die Verbrennung, also die Reaktion mit Sauerstoff als Oxidationsmittel. Das Oxidationsmittel wird dabei reduziert, es nimmt ein Elektron auf und das Reduktionsmittel, der Brennstoff, oxidiert, es gibt ein Elektron ab. Die Rostbildung auf Metalloberflächen ist ein weiteres Beispiel für die Oxidation. Am Beispiel von einem Reduktionsmittel: **A** und Oxidationsmittel: **B**, ist die Oxidation [Gl. (2.2)] die Reduktion [Gl. (2.3)] und die gekoppelte Redox-Reaktion in Gl. (2.4) gezeigt.



Im Rahmen der glykolytischen Energiegewinnung in eukaryotischen Zellen reagieren Glukose als Reduktionsmittel und Sauerstoff als Oxidationsmittel miteinander. Dabei wird Glukose zu Kohlenstoffdioxid oxidiert und Sauerstoff zu Wasser reduziert^[62]. Die Umkehrreaktion hiervon ist die Photosynthese, die Pflanzen zur Energiegewinnung nutzen^[63].

In Kapitel 5 wird mit Hilfe eines Redox-Sensors, CellRox-DeepRed, der oxidative Stresszustand von HeLa- und U2OS-Zellen über die Fluoreszenzlebenszeit und -intensität des Sensors untersucht. Abb. 2.2 zeigt schematisch die Redox-Reaktion, durch die der Sensor CellRox-DeepRed in den fluoreszenten Zustand überführt wird. Vor dieser Reaktion ist der Sensor nicht fluoreszent. Die Lokalisation dieses Sensors ist auf das Zytoplasma beschränkt, der Zellkern wird nicht signifikant gefärbt.

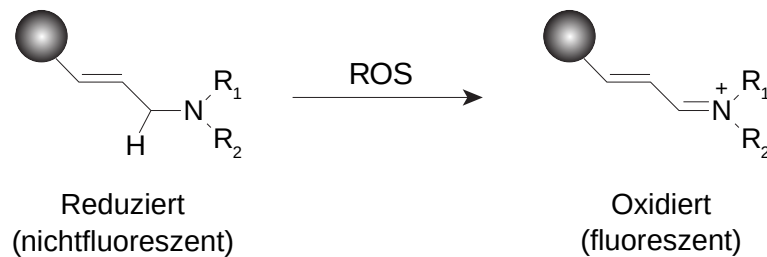


Abbildung 2.2.: CellRox-DeepRed: Aktivierung des fluoreszenten Zustands. Die Abbildung zeigt schematisch die durch ROS ausgelöste Reaktion an CellRox-DeepRed. Die schattierte Kugel symbolisiert den patentierten Farbstoff, dessen Struktur nicht näher bekannt ist. Durch die Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies wird CellRox-DeepRed in den fluoreszenten Zustand überführt. Die Abbildung wurde der Publikation^[64] entnommen und beschriftet.

2.4. Crowding-Sensor - lokale Gedrängtheit

In diesem Abschnitt wird der Mechanismus der Osmose vorgestellt, der zur Modulation der Gedrängtheit zellulärer Fluide ausgenutzt wird. Im Anschluss wird der Aufbau, das Funktionsprinzip und die intrazelluläre Lokalisation des verwendeten *Crowding*-Sensors beschrieben.

Osmose ist der passive, größenabhängige Transport einer Teilchensorte durch eine selektiv permeable Membran wie beispielsweise die Zellmembran. Dieser Mechanismus versucht die Konzentration derjenigen Moleküle auf beiden Seiten der Membran anzugleichen, für die diese undurchlässig ist. Eine wichtige Anwendung in der Medizin

ist beispielsweise die Dialyse bei Nierenversagen, die über eine vorgegebene Konzentration von spezifischen Molekülen bzw. dem Fehlen dieser zur Blutreinigung verwendet wird^[65]. Bei diesem Vorgang wird das Blut aus dem Körper ausgeleitet und über ein System von selektiv permeablen Membranen gereinigt. Neuartige Medikamente erhöhen die Porengröße der Blut-Harn-Schranke, um die Filterung von überschüssigem Blutzucker zu begünstigen. Auch im Kontext erneuerbarer Energien wird die Osmose in Osmose-Kraftwerken ausgenutzt^[66].

Die Osmolarität einer Lösung ist definiert durch das Verhältnis osmotisch aktiver Teilchen und des Bezugsvolumens. Im Gegensatz dazu verwendet die Osmolalität die Masse $m_{\text{Lösung}}$ der Lösung statt des Volumens $V_{\text{Lösung}}$. Gl. (2.5) zeigt die Definition der Osmolarität, die in dieser Arbeit verwendet wird. c_{osm} bezeichnet dabei die Osmolarität, n_{osm} die Anzahl osmotisch aktiver Teilchen und $V_{\text{Lösung}}$ das Volumen des Lösungsmittels.

$$c_{\text{osm}} = \frac{n_{\text{osm}}}{V_{\text{Lösung}}}, \quad [c_{\text{osm}}] = \frac{\text{mosmol}}{\text{l}} \quad (2.5)$$

Die Einheit der Osmolarität c_{osm} ist $\frac{\text{mosmol}}{\text{l}}$ [Gl. (2.5)]. Die Osmolarität isotonischer Lösungen, wie z.B. zellulärer Fluide im physiologischen Zustand zeigt Gl. (2.6). In dieser Arbeit wird die Einheit der Osmolarität wie folgt abgekürzt:

$$c_{\text{osm}} \approx 300 \frac{\text{mosmol}}{\text{l}} = 0.3 \frac{\text{osmol}}{\text{l}} =: 0.3 \text{ Osm}. \quad (2.6)$$

In Kapitel 6 wird durch die Veränderung der Osmolarität, also die Konzentration osmotisch aktiver Teilchen pro Volumeneinheit des Mikroskopiemediums, ein Osmolaritätsunterschied Δc_{osm} , definiert durch Gl. (2.7), zwischen Mikroskopiemedium und dem Zellinneren erzeugt.

$$\Delta c_{\text{osm}} = c_{\text{osm}}^{\text{LÖSUNG}} - c_{\text{osm}}^{\text{ZELLE}} \quad (2.7)$$

Der Osmolaritätsunterschied Δc_{osm} zwischen Mikroskopiemedium und dem Zellinnenraum bewirkt, dass Wasser aus der Zelle in die Lösung transportiert und damit das Zellvolumen verringert wird, da die Na^+ und Cl^- -Ionen in der Lösung wie auch im Zytoplasma in hydratisierter Form vorliegen und aufgrund ihrer Größe die Zellmembran nicht durchdringen können. Die Osmose versucht die Konzentration hydratisierter Ionen auf beiden Seiten der Membran anzugleichen und transportiert Wasser aus dem Zellinnenraum in das Mikroskopiemedium. Abb. 2.3 zeigt die hyperosmotische Behandlung, die in Kapitel 6 Anwendung findet. Durch Zugabe von NaCl (*sodium chloride*) in der Lösung nimmt die Gedrängtheit des Zytoplasmas durch die Volumenabnahme der Zelle zu, da das nicht zur Verfügung stehende Volumen (*excluded volume*) zunimmt^{[67] [68] [69]}. Diese Gedrängtheit eines Fluids kann mittels FRET gemessen und über die FRET-Effizienz quantifiziert werden.

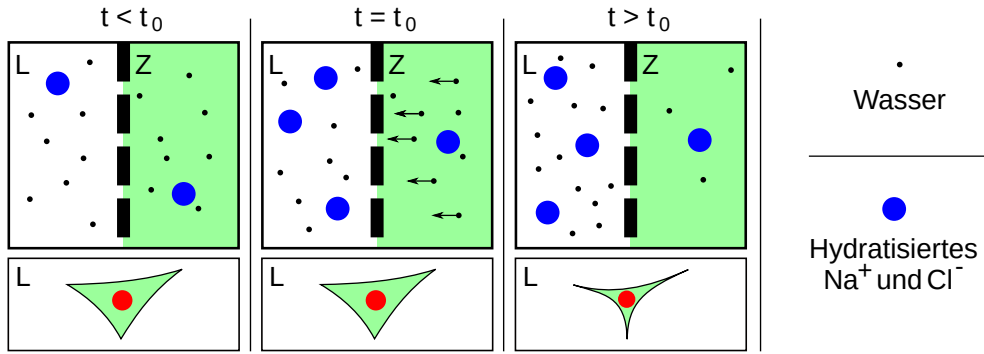


Abbildung 2.3.: Skizze der hyperosmotischen Behandlung bei $t = t_0$. Die **L**: Lösung und das **Z**: Zytoplasma wird durch die selektiv permeable Zellmembran, die durch senkrechte Strichlinien angedeutet ist, getrennt. Die Membran ist für Wasser (schwarz) durchlässig und für hydratisierte Na^+ - und Cl^- -Ionen (blau) undurchlässig. **Links:** $t < t_0$: Isoosmotischer Gleichgewichtszustand. **Mitte:** $t = t_0$: Hyperosmotische Behandlung. **Rechts:** $t > t_0$: Nach der Behandlung wird sowohl aus dem Zytoplasma als auch dem Zellkern, Wasser in die hyperosmotische Umgebung transportiert und das Zellvolumen verringert. Das Zytoplasma ist von diesem Effekt deutlich stärker betroffen als der Zellkern. Dieser Vorgang ist in der Abbildung durch die Flächenreduktion angedeutet. **Unten** ist jeweils eine exemplarische Zelle mit dem Zytoplasma (grün) und dem Zellkern (rot) gezeigt.

Ein *Crowding*-Sensor ist ein über eine molekulare Brücke verbundener Komplex aus zwei Fluorophoren. Der Sensor nutzt den abstandssensitiven Energietransfer, FRET^[70] als Funktionsprinzip aus. Abb. 2.4 zeigt die beiden Zustände des fCrH2-Sensors im nichtgedrängten und gedrängtem Milieu. Der offene Zustand wird in einfachen newtonschen Fluiden angenommen, während der geschlossene Zustand in gedrängten Fluiden (*crowded fluids*) beobachtet wird. Sind Donor und Akzeptor im Försterabstand R_F zueinander, beträgt die FRET-Effizienz 50 %. Der DNA-Vektor fCrH2 wird im gesamten Zellinnenraum, sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleoplasma exprimiert.

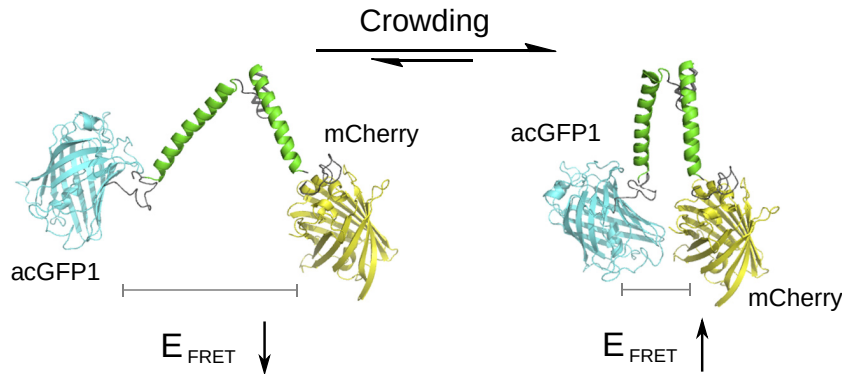


Abbildung 2.4.: Funktionsweise eines FRET-Sensors. Zu sehen ist der ursprünglich von Boersma et al. entwickelte Cerulean-Citrine FRET-Sensor, die Funktionsweise ist jedoch identisch zum verwendeten FRET-Sensor. acGFP1 ist in diesem Beispiel der Donor und mCherry der Akzeptor. Durch den Energieübertrag sinkt die Lebenszeit des FRET-Sensors. **Links:** Im offenen Zustand ist der Energieübertrag vom Donor zum Akzeptor unwahrscheinlich, die FRET-Effizienz ist also niedrig: $E_{\text{FRET}} \downarrow$. **Rechts:** Im geschlossenen Zustand ist der Energieübertrag wahrscheinlich, die FRET-Effizienz ist hoch: $E_{\text{FRET}} \uparrow$. Die Abbildung wurde der Publikation^[71] entnommen und die Beschriftung den vorliegenden Fluorophoren acGFP1 und mCherry angepasst.

Messmethoden und Datenauswertung

Die in dieser Arbeit verwendeten Messtechniken sind Methoden zur Lebenszeitmessung von Fluorophoren mit hoher räumlicher Auflösung [FLIM] oder Einzelmessungen an definierten Orten in zellulären Fluiden [FLPM (*fluorescence lifetime point measurement*)]. Dabei ist zu beachten, dass nie das Fluid gemessen wird, sondern ein, in die Zelle eingeschleuster Fluorophor (z.B. CellRox DeepRed), ein transfiziertes fluoreszenztes Protein (z.B. GFP (*green fluorescent protein*)) oder Proteinkomplex (z.B. fCrH2). Bei einer Lebenszeitmessung werden Photonenankunftszeiten fluoreszenter Moleküle mit Bezug zu einem periodischen Laserpuls über ein TCSPC-System gemessen, die zuallererst als Laborzeit-Ankunftszeit-Vektoren vorliegen.

Da prinzipiell die Art der Verteilungen der Ankunftszeiten bekannt ist [Kapitel 1.2.2], liegt es nahe, den Laborzeit-Ankunftszeit-Vektor zu histogrammieren, um die Einhüllende mittels verschiedener Auswertemethoden wie der doppel-exponentiellen Kurvenanpassung [Kapitel 3.2.2] oder Phasor [Kapitel 3.2.3] zu analysieren.

Die Datenauswertung liefert charakteristische Parameter der Ankunftszeithistogramme wie die Fluoreszenzlebenszeiten τ_i und zugehörigen Fraktionen λ_i , wobei deren Verteilungen sowohl auf den Mittelwert als auch den Mittelwertsfehler geprüft werden müssen. Des Weiteren können diese Verteilungen, je nachdem welcher Zellbehandlung sie zuzuordnen sind, mit Hilfe von Signifikanztests auf Übereinstimmung geprüft werden. Diese Tests werden im letzten Abschnitt dieses Kapitels beschrieben.

3.1. Fluorescence Lifetime Measurement Techniken

Bei den ersten Messungen zur Lebenszeit der Fluoreszenz wurde ein intensitätsmodulierter spektroskopischer Aufbau verwendet, mit dem es möglich war, die Phasenverschiebung zwischen Anregungslicht und detektierter Fluoreszenz zu messen^[72]. Die Probe wurde hierfür mit einem Dauerstrichlaser angeregt, dessen Intensität mit einer Frequenz moduliert war. Die detektierte Fluoreszenz besitzt die Frequenz der Anregungsmodulation, ist aber aufgrund der Relaxationskinetik der Fluorophore phasen-

verschoben. Diese Phasenverschiebung entspricht der mittleren Lebenszeit der Fluorophore. Die Lebenszeitmessung im Frequenzregime war die erste Methode, um die Lebenszeit der Fluoreszenz zu messen und ist seitdem vielfach weiterentwickelt worden, um auch komplexe Zusammensetzungen verschiedener Fluoreszenzlebenszeiten messen zu können. Dies erfordert jedoch die mehrfache Messung der Probe mit unterschiedlich modulierten Intensitäten^[73].

Die prominenteste Methode, zur Bestimmung der Lebenszeit von Fluorophoren, wird TCSPC genannt. Hierbei wird eine fluoreszenzfähige Probe mit einem gepulsten Laser angeregt und die Fluoreszenzphotonenankunftszeit τ_A relativ zum Anregungspuls gemessen^{[74] [75]}.

Eine zu TCSPC artverwandte Methode wird TGSPC (*time gated single photon counting*) genannt und ermöglicht wesentlich höhere Zählraten als TCSPC bei gleichzeitig niedrigerer zeitlicher Auflösung^[76].

Sowohl bei FLIM wie auch bei FLPM sind die beiden gemessenen Größen die Helligkeit und die Relaxationscharakteristik des verwendeten Sensors, lediglich mit unterschiedlicher räumlicher Auflösung und zeitlicher Statistik. Im Falle von FLPM konzentriert man sich auf ausgewählte Orte ($N_{\text{pos}} \approx 4$) und kann Histogramme mit ausgezeichneter Statistik messen ($N_{\text{phot}} \approx 10^6$). Bei FLIM ist die räumliche Auflösung ($N_{\text{pos}} \approx 10^5$ Pixel) hoch, dafür die Statistik der jeweiligen Histogramme ($N_{\text{phot}} \approx 10^3$) geringer.

Die Detektionsrate R_{det} muss bei einer Lebenszeitmessung über ein TCSPC-System niedrig im Vergleich zur Laserpulsfrequenz f_{ex} gehalten werden, um den sogenannten *pile-up*-Effekt zu vermeiden. Da die Wahrscheinlichkeit ein Photon zu messen mit zunehmender Wartezeit nach dem Laserpuls exponentiell abnimmt, besteht die Gefahr, bei sehr hohen Detektionsraten hauptsächlich kurze Ankunftszeiten und damit zu kurzen Ankunftszeiten verschobene Histogramme zu messen. Dies geht auf die Totzeiten des TCSPC-Aufbaus wie auch der SPAD zurück. Empfohlen wird eine maximale Detektionsrate $R_{\text{det}}^{\text{max}}$ ^[77], welche bei keiner Messung überschritten wurde:

$$R_{\text{det}}^{\text{max}} \approx \frac{1}{100} f_{\text{ex}} = 4 \times 10^5 \frac{\text{counts}}{\text{s}}.$$

Bei einer typischen TCSPC-Messung entsteht eine Verteilung der Photonenankunftszeiten τ_A , die eine Faltung der gerätetypischen Antwortfunktion [IRF (*instrument response function*)] mit dem Ankunftszeithistogramm ist^[78]. Die charakteristische Form einer TCSPC-Messung ist in Abb. 3.1 gezeigt. Für die Auswertung der Ankunftszeithistogramme siehe Kapitel 3.2.

Sämtliche Messungen dieser Arbeit wurden an einem kommerziellen LSM-System (SP5 - Leica Microsystems - Wetzlar - Deutschland) mit TCSPC-Unterstützung (PicoHarp 300 - PicoQuant - Berlin - Deutschland) durchgeführt. FLIM^[79] wurde als Messmethode für die Experimente in Kapitel 4 und Kapitel 5 verwendet und FLPM für die Experimente in Kapitel 5 und Kapitel 6.

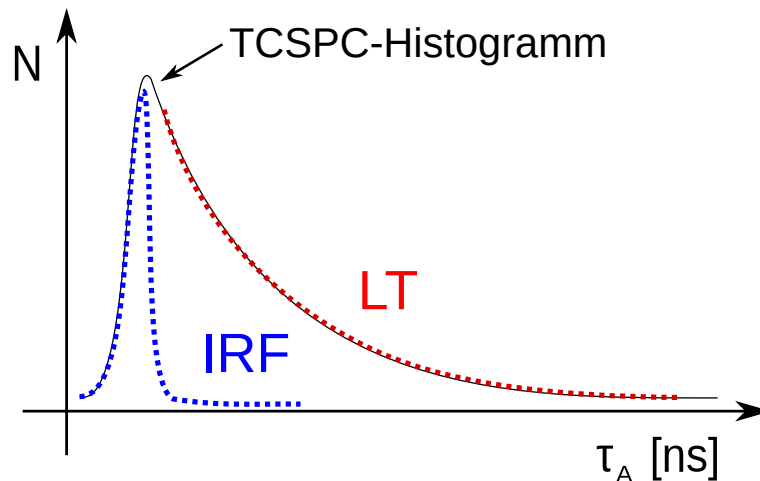


Abbildung 3.1.: Charakteristische Form eines TCSPC-Ankunftszeithistogrammes. Gezeigt ist die Faltung der IRF mit dem einfach- oder multiexponentiellen Zerfall des Ankunftszeithistogrammes. Blau ist die **IRF** gezeigt, die bei kurzen Ankunftszeiten durch das Messgerät gegeben ist und typischerweise im Bereich des Maximums des TCSPC-Histogramms zerfällt. Rot ist der Bereich des Ankunftszeithistogrammes (**LT**) gezeigt, der für die Auswertung verwendet werden kann.

3.1.1. Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

Bei der Messmethode FLIM wird mit einem LSM ein Gebiet der Größe $N_x \times N_y$ Pixel über ein implementiertes Strahlableitungssystem (gewöhnlich ein GM (*galvanometer mirror*)-Scanner) abgerastert. Während der sukzessiven Ansteuerung der Orte über den Scanner beleuchtet ein gepulster Laser mit der Pulsfrequenz $f_{\text{ex}} = 10 - 40$ MHz die Probe und ein parallel arbeitendes TCSPC-System mit implementiertem Zähler und SPAD-Detektoren misst die Ankunftszeiten der Fluoreszenzphotonen mit Bezug zum Laserpuls. Das PicoHarp-300 TCSPC-Modul speichert die Ankunftszeiten der Photonen bezüglich der Laserpulse während dem Abtastvorgang mit der zusätzlichen Information, wann eine Zeile im Bild begonnen und beendet wurde. Daraus, und aus der gewünschten Anzahl an Pixeln N_x in einer Zeile, lässt sich bestimmen, welche Ankunftszeiten zum Histogramm eines jeweiligen Pixels beitragen. Diese pixelweisen Histogramme enthalten die volle Information über die räumlich aufgelöste Lebenszeitcharakteristik der gemessenen Probe. FLIM ist in den meisten kommerziellen LSM implementiert, wie auch im verwendeten SP5 von Leica.

Die zugänglichen Einstellungsparameter sind der Ausschnitt der Probe, die Anzahl der Pixel $N_{\text{pos}} = N_x \times N_y$, die Größe des Messbereichs, die Frequenz der Laserpulse f_{ex} , die Laserintensität und die Messzeit T_{mess} oder alternativ die maximale Anzahl der gezählten Photonen pro Pixel $N_{\text{phot,max}}$. Das Resultat einer FLIM-Messung ist eine räumlich aufgelöste Matrix von Laborzeit-Ankunftszeit-Vektoren, die sowohl die lokale Helligkeit der Probe, definiert durch das Integral über die pixelweisen Vektoren, wie auch die Relaxationscharakteristik des verwendeten Sensors, definiert durch die Form des Histogramms, enthält.

Abb. 3.2 zeigt schematisch am Beispiel einer Zelle die einzelnen Schritte der FLIM-Messung, von der Datenakquise in Form der $N_x \times N_y$ -Matrix von Laborzeit-Ankunftszeit-Vektoren bis zum Histogrammieren derselben Vektoren zu Ankunftszeithistogrammen. Die auszuwertenden Pixel müssen im Allgemeinen manuell durch den Experimentator vom Hintergrund getrennt werden. Die ausgewählten Histogramme können im Anschluss orts aufgelöst über Phasor oder zusammengefasst über die doppel-exponentielle Kurvenanpassung analysiert werden.

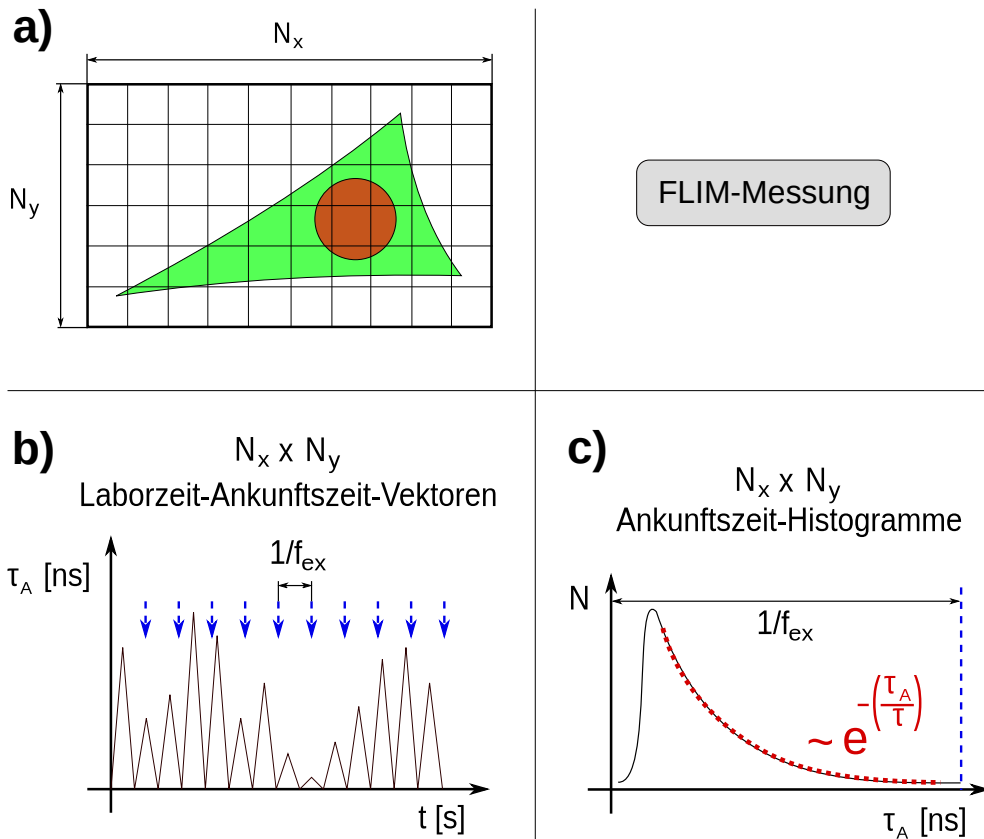


Abbildung 3.2.: Messmethode FLIM am Beispiel einer Zelle. a) Der grün markierte Bereich symbolisiert das Zytoplasma, der rote Kreis den Zellkern. Während der FLIM-Messung werden pixelweise, räumlich aufgelöst $N_x \times N_y$ Laborzeit-Ankunftszeit-Vektoren aufgenommen. b) Exemplarischer Laborzeit-Ankunftszeit-Vektor. Die blauen Pfeile symbolisieren die periodischen Laserpulse mit der Frequenz f_{ex} . c) Die bei der Messung gewonnenen $N_x \times N_y$ Laborzeit-Ankunftszeit-Vektoren können, als Histogramme dargestellt, über Phasor oder regionsspezifisch zusammengefasst über Kurvenanpassung ausgewertet werden. Zusätzlich zur Lebenszeitcharakteristik, die durch die Zerfallscharakteristik des Histogramms gegeben ist, definiert das Integral über die Ankunftszeithistogramme die lokale Helligkeit der Probe. In der Abbildung deutet die rote gestrichelte Linie einen einfachen exponentiellen Zerfall des Ankunftszeithistogrammes und den Bereich an, der für die Auswertung verwendet werden kann.

3.1.2. Fluorescence Lifetime Point Measurement

Die FLPM-Methode ist eine Variante von FLIM und ist über den implementierten FCS-Messmodus des Leica-TCS-SP5 zugänglich. Im Gegensatz zu FLIM, bei dem ein Gebiet zur Messung gewählt wird, werden bei FLPM verschiedene Einzelmessorte ausgewählt. Das TCSPC-Modul registriert während der Messung, wie auch bei FLIM, die Ankunftszeit τ_A der Photonen mit Bezug zum Laserpuls mit der Frequenz f_{ex} . Für diese Messmethode stand keine kommerzielle Methode zur Datenextraktion zur Verfügung, weshalb über ein selbst entwickeltes Programm die vom TCSPC-System abgespeicherten Binärdateien zugänglich gemacht wurden, um die Ankunftszeitvektoren auszulesen. Die zugänglichen Einstellungsparameter im FCS-Modus sind die Messorte N_{pos} , die Messzeit je Position T_{mess} , die Frequenz der Laserpulse f_{ex} und die Laserintensität. Das Resultat einer FLPM-Messung ist ein Laborzeit-Ankunftszeit-Vektor, der die photo-physikalische Information der lokalen Helligkeit wie auch der Relaxationsprozesse des verwendeten Sensors enthält.

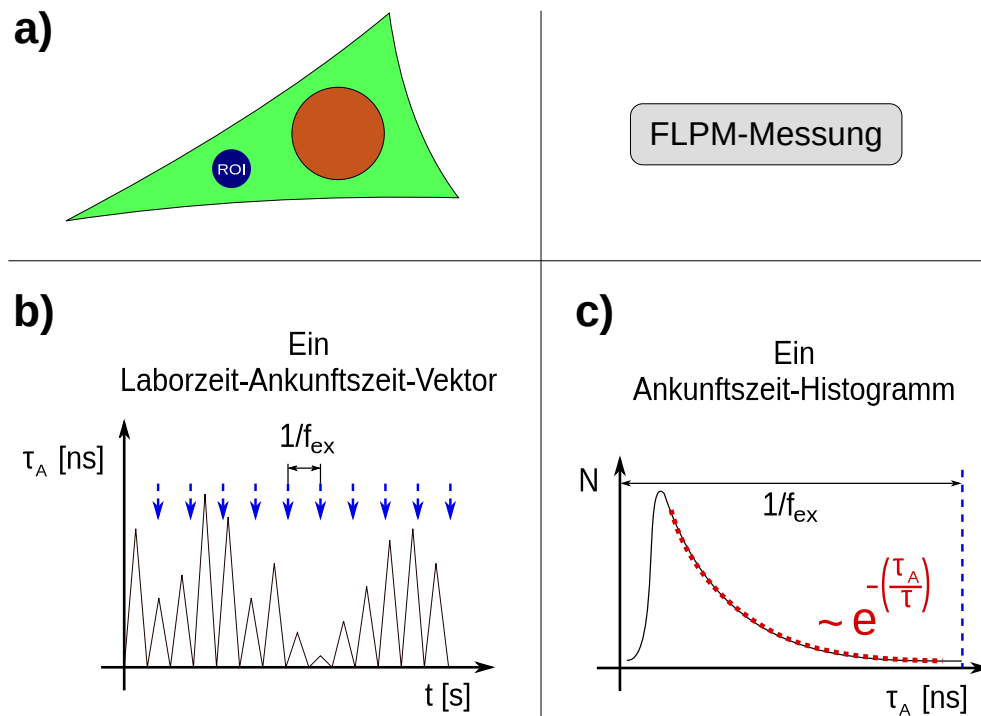


Abbildung 3.3.: Messmethode FLPM am Beispiel einer Zelle. a) Der grün markierte Bereich symbolisiert das Zytoplasma, während der rote Kreis den Zellkern darstellt. Die eingezeichnete **ROI** markiert den Messort. Während der FLPM-Messung wird räumlich aufgelöst ein Laborzeit-Ankunftszeit-Vektor aufgenommen. b) Exemplarischer Laborzeit-Ankunftszeit-Vektor. Die blauen Pfeile symbolisieren die periodischen Laserpulse mit der Frequenz f_{ex} . c) Der bei der Messung gewonnene Laborzeit-Ankunftszeit-Vektor kann als Histogramm dargestellt und über Kurvenanpassung ausgewertet werden. In der Abbildung deutet die rote gestrichelte Linie einen einfachen exponentiellen Zerfall des Ankunftszeithistogrammes und den Bereich an, der für die Auswertung verwendet werden kann.

Bei niedrigen Zählraten, $R_{det} \approx 1 \times 10^4 - 2 \times 10^4 \frac{\text{counts}}{\text{s}}$ wird nicht jedes Zeitinkrement im Laborzeit-Ankunftszeit-Vektor während der Aufnahme besetzt. Die besetzten Zei-

tinkremente enthalten in diesem Fall die Information über die Fluorophortransitzeiten durch das konfokale Volumen. Dann führt die Ersetzung der Ankunftszeit τ_A durch Einsen im Laborzeit-Ankunftszeit-Vektor auf die bekannte Zeitreihe (*time-trace*) einer FCS-Messung, die über ACF (*autocorrelation function*) ausgewertet werden kann und Aufschluss über das räumlich aufgelöste Diffusionsverhalten des Fluorophors gibt.

3.2. Datenauswertung

In diesem Abschnitt werden die verwendeten Auswertemethoden wie die Kurvenanpassung (*curve-fitting*) und die Phasor-Auswertung vorgestellt. Im Falle der Kurvenanpassung wird auf einfach- und doppelexponentielle Modelle zurückgegriffen, die Phasordarstellung dagegen benötigt keine explizite Modellannahme. Vor der Auswertung werden mit einer Maske über das FLIM-Bild die zu berücksichtigenden Pixel ausgewählt. Bei der Auswertung von Ankunftszeithistogrammen über Kurvenanpassung ist die Auswahl der beitragenden Pixel nicht kritisch, da hier die gesamte Information über die Ankunftszeiten in ein gemeinsames Histogramm zusammengefasst wird. Die Auswahl der auszuwertenden Pixel ist bei der Phasor-Auswertung dagegen ein wesentlicher Einflussfaktor und nicht vernachlässigbar. Für beide Auswerteverfahren wird ein gemeinsamer Datensatz erstellt, der sowohl für die Auswertung über Kurvenanpassung als auch für die Phasor-Auswertung verwendet werden kann.

3.2.1. Korrektur der Ankunftszeithistogramme

Beim Histogrammieren werden die gemessenen Ankunftszeiten in definierte Zeitintervalle der Breite $\Delta\tau_A = 16$ ps eingeteilt und die Häufigkeit der Photonen in diesen Intervallen als Histogrammwert $N(\tau_A)$ gezählt. Dieses Vorgehen führt dazu, dass bei einer Messzeit, die lang genug für ein glattes Histogramm ist, auch die unwahrscheinlichen Ankunftszeiten $\tau_A > 20$ ns besetzt werden [Abb. 3.4]. Je glatter ein Histogramm ist, umso zuverlässiger ist die anschließende Kurvenanalyse, da das SNR (*signal to noise ratio*) geringere Variationen der Fitparameter zulässt. Die Überbesetzung des Histogramms führt bei der Analyse über Kurvenanpassung [Kapitel 3.2.2] dazu, dass eine Konstante C (*offset*) im Fitmodell [Gl. (3.1)] verwendet werden muss.

$$N(\tau_A) = A \exp(-\tau_A/\tau) + C \quad (3.1)$$

Da die Auswertung über Phasor [Kapitel 3.2.3] jedoch kein Modell annimmt und ein Offset in die Transformation mit eingeht, müssen die Histogramme ohne die Konstante C vorliegen. Aber auch bei der Kurvenanpassung ist es generell vorteilhaft, so wenig Anpassungsparameter wie möglich zu verwenden. Aus diesen Gründen wurde eine phänomenologische Formel [Gl. (3.2)] für die Hintergrundkorrektur der Ankunftszeithistogramme ermittelt.

$$N'(\tau_A) = N(\tau_A) - I_{\text{corr}}, \quad I_{\text{corr}} = \frac{K \Delta\tau_A}{\Delta\tau_A N_{\text{bins}} - \tau_{A,s}} \sum_{n=\frac{\tau_{A,s}}{\Delta\tau_A}}^{N_{\text{bins}}} N(n). \quad (3.2)$$

In Gl. (3.2) bezeichnet K den Korrekturfaktor, der sowohl bei Phasor wie auch bei der doppel- und einfachexponentiellen Kurvenanpassung auf $K = 2$ gesetzt wurde. $\tau_{A,s} = 22.4 \text{ ns}$ ist einheitlich die Ankunftszeit, bei der die Korrektur begonnen wird. Die Anzahl der verfügbaren Zeitinkremente N_{bins} und die höchste messbare Ankunftszeit $\tau_{A,e}$ wird bei der zeitlichen Auflösung $\Delta\tau_A = 16 \text{ ps}$ des verwendeten TCSPC-Systems durch die Pulsfrequenz des Lasers $f_{\text{ex}} = 40 \text{ MHz}$ festgelegt:

$$N_{\text{bins}} = \frac{1}{f_{\text{ex}} \Delta\tau_A}, \quad \tau_{A,e} = 1/f_{\text{ex}} = 25 \text{ ns}.$$

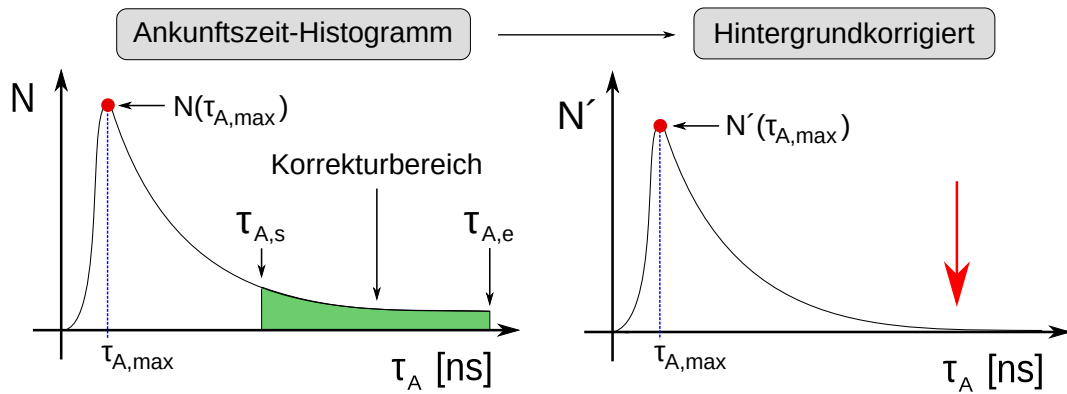


Abbildung 3.4.: Hintergrundkorrektur der Ankunftszeithistogramme. Gezeigt ist das Vorgehen bei der Hintergrundkorrektur. **Links:** Ankunftszeithistogramm vor der Hintergrundkorrektur. **Rechts:** Ankunftszeithistogramm nach der Hintergrundkorrektur. Der grüne Bereich der Ankunftszeithistogramme zwischen $\tau_{A,s}$ und $\tau_{A,e}$ wird über die Anzahl der Zeitinkremente der Breite $\Delta\tau_A = 16 \text{ ps}$ gemittelt und als doppelter Wert, $K = 2$, von jedem Histogrammeintrag abgezogen. Dieses empirische Vorgehen korrigiert zuverlässig den Grenzwert der Ankunftszeithistogramme und erlaubt damit die FT für die Phasorauswertung. Zusätzlich ist das Maximum des Ankunftszeithistogrammes, $N(\tau_{A,\text{max}})$, gezeigt das als Bezugspunkt für die Kurvenanpassung [Kapitel 3.2.2] bei $m = 0$ verwendet wird

3.2.2. Auswertung über Kurvenanpassung

Für die Kurvenanpassung in dieser Arbeit wird ein Algorithmus verwendet, der die ideale Ankunftszeit $\tau_{A,\text{id}}$ als Startwert für die Anpassung sucht. Die Parameter dieser Fitkurve werden anschließend für die weitere Analyse verwendet. Die Kurvenanpassung reagiert sehr sensitiv sowohl auf die Anfangswerte als auch den anzupassenden Bereich, weshalb als Bewertungskriterium das Residuum zwischen experimentellem Histogramm und Fitkurve gewählt wird.

Für die Kurvenanpassung wird zuerst das Maximum der Ankunftszeithistogramme $N(\tau_{A,\text{max}})$ gesucht und für $M = 100$ Zeitinkremente der Breite $\Delta\tau_A = 16 \text{ ps}$ nach dem Maximum je ein einfachexponentieller Fit [Gl. (3.3)] oder doppel-exponentieller Fit [Gl. (3.4)] angelegt. Die einfachexponentielle Kurvenanpassung wird ausschließlich zur Bewertung des Kurvenverlaufs der Ankunftszeithistogramme in Kapitel 5 verwendet.

$$F_m(\tau_A) = f_1 \exp(-\tau_A/\tau_1) \quad (3.3)$$

$$F_m(\tau_A) = \xi_{\text{st}}[f_1 \exp(-\tau_A/\tau_1) + (1 - f_1) \exp(-\tau_A/\tau_2)] \quad (3.4)$$

Für diese $m \in M$ Kurvenanpassungen wird die mittlere quadratische Abweichung, im Folgenden Residuenfunktion $R(m)$ [Gl. (3.5)] genannt zwischen normiertem Fit $F_m(\tau_A)$ und normiertem Histogramm $N(\tau_A)$ pro Zeitinkrement $\Delta\tau_A$ berechnet:

$$R(m) = \frac{1}{N_h - m} \sum_{n=1}^{N_h - m} (N(\tau_{A,n}) - F_m(\tau_{A,n}))^2, \quad N_h = N_{\text{bins}} - \frac{\tau_{A,\text{max}}}{\Delta\tau} \quad (3.5)$$

Dabei bezeichnet $0 < m < 100$ den Versatzparameter und N_h die verfügbare Zahl der Histogrammeinträge. Die Anpassungsparameter f_1 , τ_1 und τ_2 der Kurve $F_{m_0}(\tau_A)$, für welche $R(m_0)$ minimal ist, werden für die weitere Analyse ausgewählt. Der gefundene Versatzparameter m_0 minimiert damit die Residuenfunktion und legt den Startwert der Kurvenanpassung auf $\tau_{A,\text{id}} = \frac{m_0}{\Delta\tau_A}$ fest. Abb. 3.5 zeigt das charakteristische Verhalten von $R(m)$.

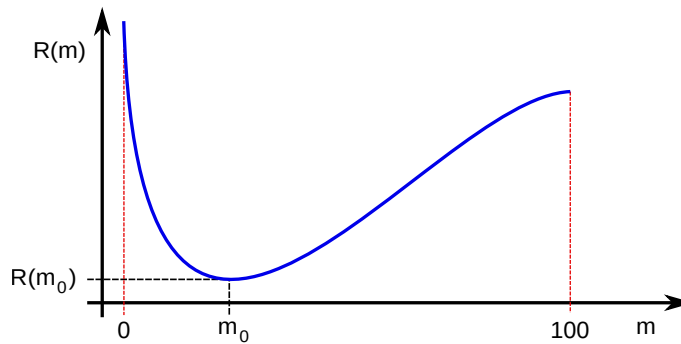


Abbildung 3.5.: Charakteristik der Residuenfunktion. Gezeigt ist die typische Form der Residuenfunktion $R(m)$, die als Bewertungskriterium für die jeweiligen Kurvenanpassungen verwendet wurde. m bezeichnet die diskretisierte Verschiebung des Startwertes für die Kurvenanpassung, bezogen auf das Maximum $N(\tau_{A,\text{max}})$ des Ankunftszeithistogrammes bei $\tau_{A,\text{max}}$. Dabei entspricht eine diskretisierte Verschiebung von $\Delta m = 1$ einer zeitlichen von $\Delta\tau_A = 16$ ps.

3.2.3. Phasor - Theorie und Methode

Phasor, auch Cole-Cole-Diagramm genannt, bezeichnet eine Darstellungsart von Funktionen im komplexen Zahlenraum. Sie geht ursprünglich auf die Brüder Kenneth S. Cole und Robert H. Cole zurück, die sie für die Darstellung von frequenzabhängigen Permittivitäten nutzten^{[80][81]}. Sie wird auch für die Auswertung von FCS-Daten, genannt Phasor-FCS, verwendet^[82]. Mittels der Phasor-Darstellung lassen sich aus den Verteilungen einer Ankunftszeitmessung eines Ensembles an Fluorophoren die Lebenszeiten der einzelnen Fluorophore rekonstruieren. In diesem Kapitel wird die Theorie der Phasor-Darstellung im Hinblick auf einfach- und doppel-exponentielle Ankunftszeithistogramme vorgestellt.

Einfachexponentielle Ankunftszeithistogramme

Im Falle von FLIM bezieht sich die Phasordarstellung auf die Darstellung von Ankunftszeithistogrammen [Kapitel 1.2]. Ein Ankunftszeithistogramm $N(\tau_A)$ hat im Falle eines einfachen Fluorophors die Form einer Exponentialkurve:

$$N(\tau_A) = A \exp\left(-\frac{\tau_A}{\tau}\right). \quad (3.6)$$

Dabei bezeichnet $N(\tau_A)$ die Verteilung der Photonenankunftszeiten, A die Normierungskonstante und τ die Zerfallskonstante, nach der die Wahrscheinlichkeit, dass der Fluorophor ein Photon emittiert, kleiner als $A \cdot 1/e$ ist. Die Fouriertransformation [Gl. (3.7)] von $N(\tau_A)$ ergibt die Phasor-Koordinaten:

$$g(\omega) = \frac{\int_0^\infty N(\tau_A) \cos(\omega \tau_A) d\tau_A}{\int_0^\infty N(\tau_A) d\tau_A}, \quad s(\omega) = \frac{\int_0^\infty N(\tau_A) \sin(\omega \tau_A) d\tau_A}{\int_0^\infty N(\tau_A) d\tau_A}. \quad (3.7)$$

$$g(\omega) = \frac{1}{1 + (\omega\tau)^2}, \quad s(\omega) = \frac{\omega\tau}{1 + (\omega\tau)^2}. \quad (3.8)$$

In Gl. (3.8) bezeichnet $g(\omega)$ den Realteil der FT und $s(\omega)$ den Imaginärteil der FT. Sowohl der Real- als auch der Imaginärteil sind einheitenlose Größen. Beide zusammen bilden einen Vektor (g, s) im komplexen Zahlenraum. Für festes τ und $0 \leq \omega \leq \infty$ beschreiben die Werte von (g, s) einen Halbkreis im ersten Quadranten des kartesischen Koordinatensystems mit dem Radius $r_H = 0.5$ und dem Mittelpunkt $M_H = (0.5, 0)$. Für festes ω und $0 \leq \tau \leq \infty$ fährt der Vektor (g, s) den Halbkreis von rechts $(1, 0)$ ($\tau = 0$) nach links $(0, 0)$ ($\tau \rightarrow \infty$) ab und jede Lebenszeit τ wird auf einen Ort auf dem Halbkreis abgebildet. Die Kreisfrequenz ω muss für die Phasor-Darstellung so gewählt werden, dass Gl. (3.9) erfüllt wird.

$$\omega = \frac{2\pi}{T_{\text{ex}}}, \quad T_{\text{ex}} \gg \tau. \quad (3.9)$$

Führt man FLIM-Messungen durch, wird $T_{\text{ex}} = N_h \Delta\tau_A$ mit N_h der Anzahl verwendeter Stützstellen der zeitlichen Breite $\Delta\tau_A = 16$ ps. Für alle Phasor-Auswertungen dieser Arbeit gilt $N_h = 512$ oder $N_h = 1024$.

Da für die Phasor Darstellung lediglich die Fouriertransformierte bei einem einzigen ω verwendet wird, reicht es die Transformation nur für dieses ω durchzuführen. Damit verringert sich die Komplexität $\mathcal{K}^{[83]}$ der numerischen Berechnung von $\mathcal{K}_i = \mathcal{N}_h \log(\mathcal{N}_h)$ auf $\mathcal{K}_f = \log(\mathcal{N}_h)$ pro Histogramm. Dabei ist N_h die Anzahl der Stützstellen der FT.

Doppel exponentielle Ankunftszeithistogramme

Im Allgemeinen liegt in einer heterogenen Lösung, wie beispielsweise dem Zytoplasma^[84], derselbe Fluorophor in verschiedenen Zuständen vor, die alle zu einer bestimmten Lebenszeit τ_i führen können. Hierfür können Fluoreszenzlöschungsprozesse wie auch

intramolekulare Zustandsänderungen des Sensors, bzw Reaktionen auf die lokale Umgebung verantwortlich sein. Falls die Ankunftszeithistogramme aus zwei Teilhistogrammen mit verschiedenen Lebenszeiten $\tau_{1,2}$ und Amplituden $f_{1,2}$ bestehen, führt die Phasortransformation dazu, dass sich die Phasor-Koordinaten entlang einer Linie anordnen. Extrapoliert man diese Linie zum Halbkreis, wie in Abb. 3.6 gezeigt, erhält man über Gl. (3.10) die zugehörigen Lebenszeiten auf dem Universalhalbkreis.

$$N(\tau_A) = f_1 e^{-\frac{\tau_A}{\tau_1}} + f_2 e^{-\frac{\tau_A}{\tau_2}} \rightarrow \tau_{1,2} = \frac{1}{\omega} \frac{s_{(1,2)}(\omega)}{g_{(1,2)}(\omega)} \quad (3.10)$$

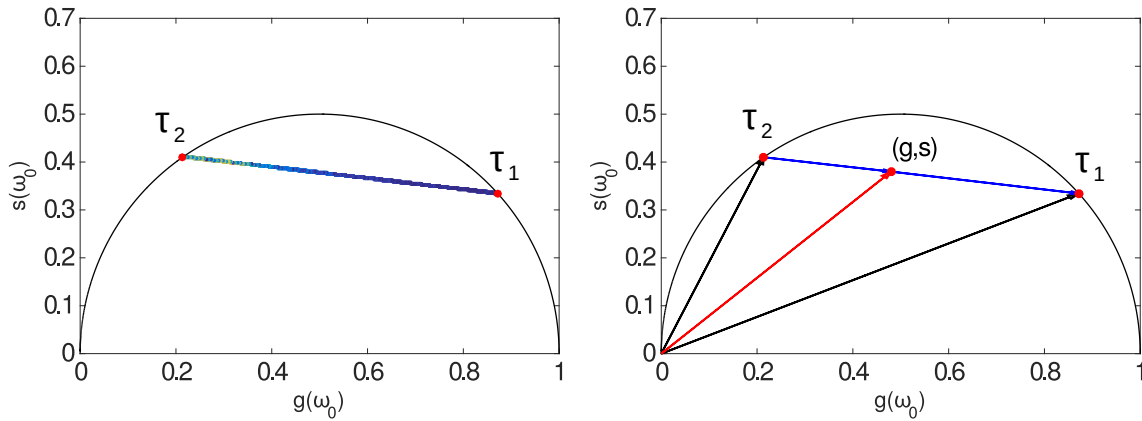


Abbildung 3.6.: Phasor-Darstellung doppel-exponentieller Histogramme. Links: Die Phasor-Transformation von $N_{\text{hist}} = 5 \cdot 10^4$ numerisch erstellten Histogrammen, die zufällige Kompositionen der beiden Lebenszeiten $\tau_1 = 1$ ns sowie $\tau_2 = 5$ ns enthalten. Der Farbverlauf der Verbindungslinie zwischen τ_1 und τ_2 gewichtet die Häufigkeit der jeweiligen Fraktion. Rechts: Die vektorielle Rekonstruktion mit dessen Hilfe für jeden Phasorpunkt der Beitrag λ_i der Lebenszeit τ_i bestimmt werden kann. (g, s) ist ein komplexer Vektor mit Realteil g und Imaginärteil s . Der Vektor zeigt auf einen Ort auf der Verbindungslinie zwischen τ_1 und τ_2 . Die Fraktionen λ_i der Lebenszeiten τ_1 und τ_2 können über Gl. (3.11) ermittelt werden.

Im doppel-exponentiellen Fall werden für die Phasor-Auswertung lediglich zwei Messpunkte mit jeweils verschiedenen Fraktionen $\lambda_1 \neq \lambda_2$ benötigt. Damit ist gemeint, dass für die Identifizierung der beiden Zerfallskomponenten zwei Messungen der doppel-exponentiellen Zerfälle notwendig sind, wobei bei beiden Messungen die Fraktionen λ_i der $\tau_{1,2}$ verschieden sein müssen. Diese Fraktionen λ_i sind mit dem jeweiligen Punkt im Phasorraum (g, s) über Gl. (3.11) verknüpft. In Abb. 3.6 zeigt der Vektor (g, s) auf eine zufällige Komposition der Lebenszeiten τ_1 und τ_2 .

$$\lambda_2 = \frac{|(g, s) - (g_1, s_1)|}{|(g_2, s_2) - (g_1, s_1)|}, \quad \lambda_1 = 1 - \lambda_2. \quad (3.11)$$

Bei drei oder mehr Lebenszeitkomponenten wird die Auswertung der Lebenszeiten τ_i und Beiträge λ_i über Phasor deutlich aufwändiger und wird in den Publikationen von Malacrida et al.^[85] und Farzad et al.^[86] untersucht und diskutiert.

3.2.4. Phasor-Analyse experimenteller Ankunftszeithistogramme

Im Vergleich zur theoretischen Phasordarstellung [Abb. 3.6], wird in Abb. 3.7 die Charakteristik der Phasordarstellung experimenteller Ankunftszeithistogramme deutlich. In der Abbildung fällt auf, dass die Phasorpunkte nicht wie zuvor beschrieben entlang einer Linie, sondern in einem ellipsoiden Bereich angeordnet sind. Die Ursache für die ellipsoide Form ist die Abweichung der Einzelankunftszeithistogramme vom idealen doppel-exponentiellen Verlauf durch das experimentell niedrigere SNR. Die Elongation deutet auf einen doppel-exponentiellen Zerfall der Ankunftszeithistogramme. Eine sphärische Verteilung im Phasorraum deutet dagegen auf einen im Mittel einfach-exponentiellen Zerfall der Ankunftszeithistogramme. Die ellipsoid angeordneten Phasorpunkte in Abb. 3.7 werden im Folgenden auch zusammengefasst „Phasorwolke“ genannt.

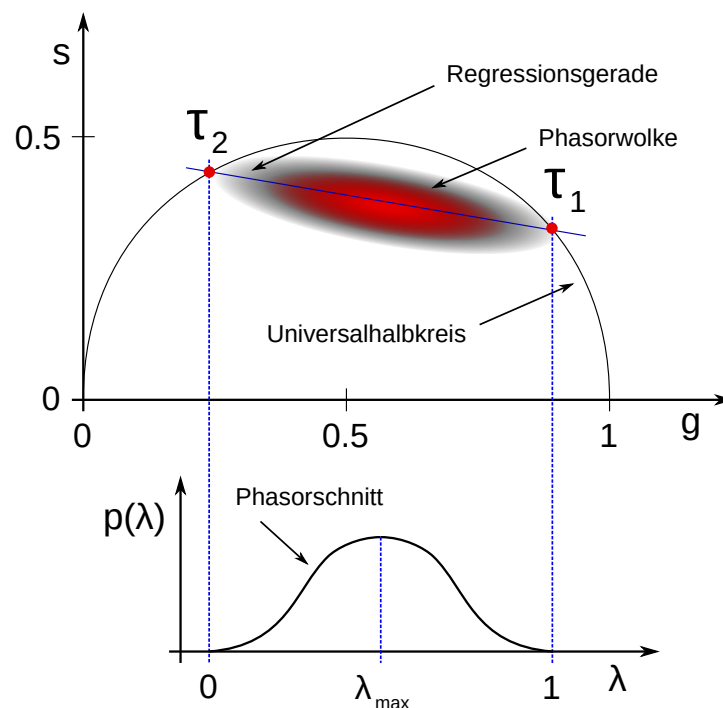


Abbildung 3.7.: Phasor-Darstellung doppel-exponentieller Ankunftszeithistogramme mit niedrigem SNR. g : Realteil der Ankunftszeithistogramm-FT, s : Imaginärteil der Ankunftszeithistogramm-FT. In der Abbildung wird der Histogrammcharakter der Phasordarstellung deutlich, da verschiedene Pixel einer transformierten FLIM-Messung auf denselben Ort im Phasorraum fallen können und damit die jeweiligen Lebenszeiten gewichten. Rote Bereiche sind besonders häufig und schwarze selten. Die Verteilung der Phasorpunkte ist ellipsoid, die Phasorwolke ist elongiert. Um die Häufigkeit der jeweiligen Fraktionen $\lambda_2 = 1 - \lambda_1$ zu analysieren, wird die Phasorwolke entlang der Regressionsgerade auf die Häufigkeitswerte der Phasorverteilung abgetastet. In dieser Abbildung ist die Projektion von $p(\lambda)$ gezeigt. Der Verlauf der Phasorwolke entlang der Regressionsgerade $p(\lambda)$ wird „Phasorschnitt“ genannt. Die Zuweisung $\lambda = 0$ bei τ_2 und $\lambda = 1$ bei τ_1 führt zu $p(\lambda) = p(\lambda_1)$.

Die Phasorwolke wird mittels linearer Regressionsanalyse angepasst, die Schnittpunkte mit dem Universalkreisbogen definieren die Lebenszeiten τ_1 und τ_2 . In der Abbildung wird auch der Histogrammcharakter der Phasordarstellung deutlich, da verschiedene

Pixel einer transformierten FLIM-Messung auf denselben Ort im Phasorraum fallen können und damit die Fraktionen λ_1 und λ_2 der Lebenszeiten bestimmen. Die Analyse der Phasordarstellung entlang der Regressionsgerade ist in Abb. 3.7 gezeigt und wird in Kapitel 3.2.4 erklärt.

Während im gezeigten Beispiel jeder Pixel einer FLIM-Messung zu einem Punkt des Phasorhistogrammes beiträgt, ist es ebenso möglich, alle pixelweisen Histogramme einer Messung zusammenzufassen (*binning*) und so ein Zellensemble in einem komplexen Phasorplot darzustellen. Diese Darstellungsart, Zellensemble-Phasor genannt, wird in Kapitel 5.4.3 genutzt, um Behandlungsarten und Zelltypen direkt gegenüberzustellen und zu vergleichen.

Verteilung der Fraktionshäufigkeit - Phasorschnitte

Die Abtastung der Phasorhistogramme entlang der Regressionsgerade ergibt eine Verteilung der Lebenszeitfraktionen λ zwischen den Grenzlebenszeiten τ_1 und τ_2 und wird „Phasorschnitt“ $p(\lambda)$ genannt. Diejenigen Phasorpunkte, die nicht auf der Regressionsgerade liegen, werden für die weitere Untersuchung nicht verwendet. Der Teil der Regressionsgerade, der innerhalb des Universalhalbkreises liegt und die Grenzlebenszeiten τ_1 und τ_2 verbindet, wird auf die Länge Eins normiert. Dabei wird dem Schnittpunkt bei der kleineren Lebenszeit τ_1 der Wert $\lambda = 1$ und dem Schnittpunkt bei der größeren Lebenszeit τ_2 der Wert $\lambda = 0$ zugeordnet. Die Zuweisung der Zwischenwerte von λ ist linear, da die verschiedenen Lebenszeitfraktion in der Phasordarstellung ebenfalls linear abgebildet werden. Diese Normierung bedeutet gleichzeitig, dass die Verteilung der Lebenszeitfraktionen $p(\lambda)$ der Verteilung der Fraktionen der kleineren Lebenszeit entspricht, $p(\lambda) = p(\lambda_1)$. Die mittlere Lebenszeit $\langle\tau\rangle$ kann über Gl. (3.12) abgeschätzt werden. In der folgenden Gleichung bezeichnet $\lambda_{1,\max}$ das Maximum der Fraktionsverteilung $p(\lambda_1)$.

$$\langle\tau\rangle = \lambda_{1,\max}\tau_1 + (1 - \lambda_{1,\max})\tau_2 \quad (3.12)$$

Rauschkorrektur und Abschneideparameter

Der wesentliche Unterschied zwischen theoretischen und experimentellen Phasorverteilungen liegt in der Statistik der pixelweisen Histogramme, da letztere je nach Messung weniger als $N_{\text{phot}} = 100$ Photonen enthalten können. Dadurch sind zusätzliche Parameter bei der Phasor-Auswertung der Ankunftszeithistogramme nötig.

Eingeführt wird die Anzahl transformierter Zeitinkremente des aufgenommenen Ankunftszeithistogrammes $N_h \leq N_{\text{bins}}$ und der Glättungsfaktor N_s . Die Anzahl transformierter Zeitinkremente N_h muss im Vergleich zur Gesamtzahl N_{bins} nicht zwingend reduziert sein, dies ist aber hilfreich, um bei Messungen mit wenigen Photonen je Histogramm die bestmögliche Auflösbarkeit der Lebenszeiten zu gewährleisten. Bei FLIM-Experimenten kommt es teilweise vor, dass Histogramme über $\tau_A \approx 8 \text{ ns}$ gar keine

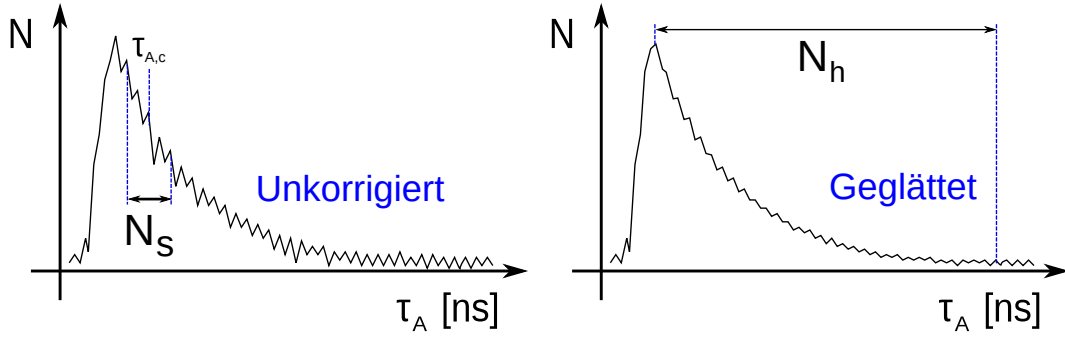


Abbildung 3.8.: Glättung der Ankunftszeithistogramme und Auswahl des Phasor-Transformationsbereichs. Gezeigt ist die Glättung der Ankunftszeithistogramme und die Beschränkung der Phasor-Transformation auf den wesentlichen Bereich des Ankunftszeithistogrammes. N_s ist der Glättungsfaktor, der bestimmt, über wie viele Zeitinkremente die Glättung erfolgt, und $N(\tau_{A,c})$ der zu glättende Wert des Ankunftszeithistogrammes. N_h bestimmt den Bereich des Ankunftszeithistogrammes, der für die weitere Auswertung verwendet wird.

Photonen enthalten. Wählt man für die Transformation trotzdem den gesamten Bereich, $N_{\text{bins}} = 1562$ liegen zwei Lebenszeiten näher zusammen als bei $N_h = 512$, da der Bildraum derselbe bleibt. Dadurch sinkt die Auflösbarkeit der Lebenszeiten in der Phasordarstellung und die Genauigkeit der Regressionsanalyse nimmt ab.

Die Glättung N_s andererseits muss eingeführt werden, da ansonsten bei Histogrammen mit wenigen Photonen aufgrund des niedrigen SNR die Normierungskonstante des Phasorpunktes, also das Integral über das Ankunftszeithistogramm, geringer ausfällt als für die zugehörige Lebenszeit erwartet. Dies führt dazu, dass Phasorpunkte außerhalb des Universalhalbkreises abgebildet werden und die Phasorwolke im komplexen Zahlenraum in manchen Fällen vollkommen falsch liegt. In diesem Zusammenhang wurden vertikal ausgerichtete Phasorwolken beobachtet und solche, deren Regressionsgerade komplett außerhalb des Universalhalbkreises lag. Vertikal ausgerichtete Phasorverteilungen deuten auf eine negative Zerfallskonstante $\tau_{(1,2)}$. Wenn die Regressionsgerade der Phasorverteilung andererseits außerhalb des Universalhalbkreises liegt, bedeutet dies, dass beide Lebenszeiten τ_1 und τ_2 komplex sind. Beide Varianten sind unmöglich und müssen deshalb als Fehler klassifiziert werden.

Die Glättung ermöglicht die Transformation aller Histogramme, es muss jedoch berücksichtigt werden, dass diese Korrektur die ausgewerteten Lebenszeiten tendenziell zu größeren Werten verschiebt. Die Vorbereitung der Ankunftszeithistogramme für die Phasor-Transformation mit Hilfe der Glättung N_s und der Bereichsauswahl N_h ist in Abb. 3.8 gezeigt.

3.2.5. Fehler und Fehlerrechnung

In dieser Arbeit wird grundsätzlich das Ensemblemittel [Index E] der ausgewerteten Lebenszeiten τ_i und Fraktionen λ_i mit zugehörigem Fehler s_E in der Form $\langle \tau_i \rangle_E \pm s_E$ und $\langle \lambda_i \rangle_E \pm s_E$ angegeben [Gl. (3.13) und Gl. (3.14)]. In den folgenden Gleichungen steht

G stellvertretend für diese Größen. Zu beachten ist, dass das Auflösungsvermögen des TCSPC-Aufbaus, PicoHarp 300, bei $s_{\text{harp}} = 16$ ps liegt und die Fehler der Resultate s_E diesen Wert teilweise deutlich unterschreiten. Um eine realistische Einschätzung tatsächlicher Lebenszeitänderungen zu erhalten, muss der Auflösungsfehler des TCSPC-Aufbaus s_{harp} berücksichtigt werden.

$$\langle G \rangle_E = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N G_j \quad (3.13)$$

$$s_E = s(\langle G \rangle_E) = \sqrt{\frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^N (G_j - \langle G \rangle_E)^2} \quad (3.14)$$

Im Projekt über die orts aufgelöste Gedrängtheit zellulärer Fluide [Kapitel 6] werden FRET-Effizienzen aus Lebenszeiten berechnet. Dort wird der angegebene Fehler mit Hilfe der Fehlerfortpflanzung [Gl. (3.15)] aus den Fehlern der Lebenszeiten berechnet. Betrachtet man Differenzen oder Summen von fehlerbehafteten Größen G_1 und G_2 , müssen die Fehler der Einzelgrößen s_{G_1} und s_{G_2} quadratisch summiert werden, um den Fehler der Summe oder Differenz [Gl. (3.16)] zu erhalten.

$$s_F = s(G)_F = \sqrt{\sum_{x_i}^{x_N} \left(\frac{\partial G}{\partial x_i} s_{x_i} \right)^2} \quad (3.15)$$

$$s_D = s_{\text{Summe/Differenz}} = \sqrt{s_{G_1}^2 + s_{G_2}^2} \quad (3.16)$$

Fehler der Hintergrundkorrektur

Um die Genauigkeit der Hintergrundkorrektur [Gl. (3.2)] zu prüfen, wurden experimentelle Histogramme nach Kapitel 3.2.2 mit zusätzlicher Konstante C im doppel-exponentiellen Modell angepasst. Der Wert von C überstieg in keinem Fall $\sim 0.2\%$ des Maximalwertes $N(\tau_{A,\text{max}}) = 1$. Damit kann festgehalten werden, dass die Hintergrundkorrektur nach der beschriebenen Vorgehensweise in Kapitel 3.2.1 in allen Fällen zuverlässig den Grenzwert der Ankunftszeithistogramme angleicht und eine zusätzliche Konstante C im Modell überflüssig macht:

$$\lim_{\tau_A \rightarrow \infty} N(\tau_A) \rightarrow 0.$$

Allgemeine Fehler der Kurvenanpassung

Die Resultate der doppel-exponentiellen Kurvenanpassung τ_1 , τ_2 und f_1 sind abhängig vom SNR der Ankunftszeithistogramme, der Ausprägung des Histogrammmaximums, der Ausprägung der IRF, der Anfangswerte der Anpassung, der Zahl der Fitparameter und des Startwertes $\tau_{A,\text{id}}$. Da der Verlauf der Ankunftszeithistogramme generell nach dem Maximum von einer Rechtskrümmung zu einer Linkskrümmung wechselt, und die Anpassung erst nach diesem Wendepunkt begonnen werden darf, ist die Wahl

des Startwertes $\tau_{A,id}$ kritisch. Verwendet man als Startwert $\tau_{A,id}$ einen festen Wert, der zwischen Wendepunkt und Histogrammmaximum liegt, fließt in die Anpassung ein Spektrum aus Lebenszeiten ein, die eigentlich Teil der IRF und nicht der Photophysik des Fluorophors zugehörig sind. Verwendet man einen festen Startwert, der zu weit rechts liegt, werden große Lebenszeiten gegenüber kleineren wegen dem SNR des Histogramms bevorzugt. Generell ist auch möglich, dass die Ankunftszeithistogramme höhere Linearkombinationen aus Lebenszeiten enthalten, die aber über die Kurvenanpassung nicht mehr zuverlässig bestimmt werden können. Der vorgestellte Algorithmus filtert in allen Fällen zuverlässig den Fitbereich mit zugehörigem $\tau_{A,id}$, der am besten dem Modell des doppelexponentiellen Zerfalls gleicht.

Allgemeine Fehler der Phasortransformation und Phasorauswertung

Bei der Auswertung mittels Phasor darf nicht unerwähnt bleiben, dass sich ein zwei- oder mehrkomponentiger Histogrammzerfall, bei dem jeweils zwei oder mehr Lebenszeiten benachbart sind, gleichermaßen ellipsoidförmig im Phasorplot zeigt. Die Schwierigkeit der Separation in einem solchen Fall liegt darin, dass die Lebenszeit τ entlang des Universalhalbkreises nicht linear skaliert.

Berechnet man die Differenz zweier Phasorvektoren bei $\omega = 1 \frac{1}{s}$, von denen ersterer auf $\underline{\tau}$ und zweiterer auf $\underline{\tau} + \underline{\delta\tau}$ zeigt und bildet den Betrag $\Delta_{\text{phasor}}(\underline{\tau}, \underline{\delta\tau})$, erhält man Gl. (3.17). Hierbei sind $\underline{\tau}$ und $\underline{\delta\tau}$ einheitenlose Lebenszeiten bzw. Lebenszeitdifferenzen. Das Vorgehen ist in Abb. 3.9 zu sehen.

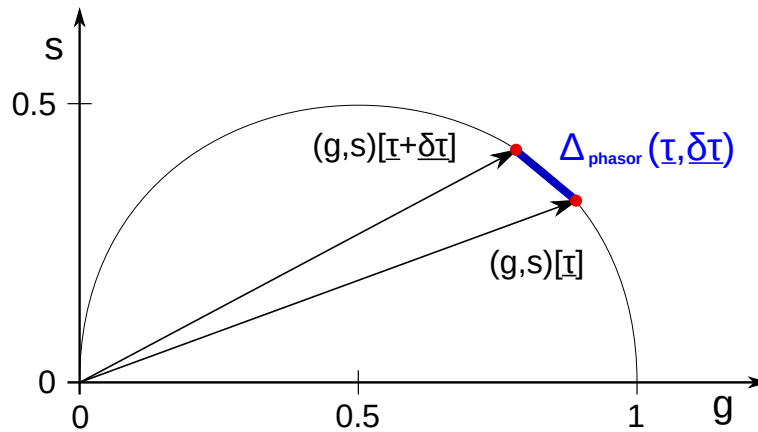


Abbildung 3.9.: Skalierungsverhalten der Lebenszeiten im Phasorplot. Gezeigt ist die Skizze zur Herleitung des Abstandes zweier Lebenszeiten im Phasorplot. Da die Skalierung nicht linear verläuft, ist der Abstand zwei großer Lebenszeiten im komplexen Zahlenraum kleiner als zwei kleiner bei gleichem zeitlichen Abstand $\underline{\delta\tau}$.

$$\Delta_{\text{phasor}}(\underline{\tau}, \underline{\delta\tau}) = \frac{\underline{\delta\tau}}{\sqrt{[1 + (\underline{\tau} + \underline{\delta\tau})^2](1 + \underline{\tau}^2)}} \quad (3.17)$$

Das heißt, dass die Trennung zwei kleiner Lebenszeiten τ_1 und $\tau_1 + \delta\tau$ im Phasorraum einfacher ist als die Trennung zwei größerer τ_2 und $\tau_2 + \delta\tau$, wenn der zeitlich Ab-

stand $\delta\tau$ identisch ist. Man erhält eine mindestens invers quadratische Abhängigkeit für $\Delta_{\text{phasor}}(\tau, \delta\tau)$ bei zunehmendem τ .

Da die lineare Regressionsanalyse den Phasorraum homogen bewertet, ist der Fehleinfluss bei kleineren Lebenszeiten τ_1 tendenziell kleiner als bei größeren Lebenszeiten τ_2 . Die lineare Regressionsanalyse richtet den Vektor, wie auch den Schwerpunkt der Hauptachse, gemäß der lokalen Häufigkeit der Phasorpunkte in der Phasorwolke aus. Sind viele Phasorpunkte in einer kleinen Umgebung zu finden, erhöht sich die Genauigkeit der linearen Regression lokal im Phasorraum. Die Fehleranfälligkeit der τ_1 und τ_2 kann bei Messungen mit einer besonders großen Fraktion großer Lebenszeiten deshalb ausgeglichen sein. Sind die Fraktionen im Phasorraum hauptsächlich bei der kleineren Lebenszeit zu finden, wird der Fehler der größeren Lebenszeit τ_2 umso größer. Diese Tendenz ist immer vorhanden und sollte bei der Betrachtung der Phasorhistogramme berücksichtigt werden.

Die experimentellen Phasorpunkte sind im Phasorraum in einer Umgebung des theoretischen Ortes zu finden, deren Größe invers von der Pixelhelligkeit, dem Integral über das Ankunftszeithistogramm, abhängt. Im Falle von doppel-exponentiellen Ankunftszeithistogrammen liegt dieser theoretische Ort auf der Verbindungslinie der Lebenszeiten im Phasorplot. Trotzdem kann man nicht folgern, dass ein experimenteller Phasorpunkt, der auf der Verbindungslinie liegt, fehlerfrei ist.

3.2.6. Statistische Signifikanz und Signifikanztests

Um über eine quantitative Größe eine zuverlässige Aussage treffen zu können, wird diese in Experimenten viele Male gemessen. Histogrammiert man die Resultate dieser Größe, erhält man eine Verteilung, die nach der Normierung aussagt, wie wahrscheinlich es ist, bei einer zusätzlichen Messung einen bestimmten Wert zu erhalten. Wird dieselbe Größe nun unter zwei verschiedenen Bedingungen gemessen, erhält man analog zwei Verteilungen. Die Frage ist dann, ob diese Verteilungen sich wesentlich unterscheiden. Eine intuitive Beantwortung dieser Frage ist möglich, wenn man die Mittelwerte der Verteilungen mit den zugehörigen Standardabweichungen betrachtet. Unterscheiden sich die Mittelwerte mindestens um den Mittelwert der Standardabweichungen der Einzelverteilungen, kann man sagen, dass die Verteilungen nicht derselben Grundgesamtheit angehören. Das heißt die verschiedenen Messbedingungen spiegeln sich in den Erwartungswerten der Einzelverteilungen wider.

Im Allgemeinen sind die Unterschiede in den Messwerten gering und deren Signifikanz auf diese einfache Weise nicht zu beurteilen, da zur Charakterisierung zweier Verteilungen die ersten beiden Momente, der Mittelwert und die Standardabweichung, meistens nicht ausreichen. An dieser Stelle werden zur Bewertung signifikanter oder nicht signifikanter Unterschiede statistische Tests verwendet.

Am Anfang aller Signifikanztests steht die Grundannahme, auch Nullhypothese ge-

nannt, dass die beiden Verteilungen zufällige Kompositionen von Einzelwerten derselben Grundgesamtheit sind. Im Anschluss wird der p -Wert nach einem testtypischen Algorithmus berechnet. Der p -Wert beschreibt die Wahrscheinlichkeit im Intervall $[0 - 1]$, bei einem zufälligen Experiment gleiche oder extremere Werte als die gemessenen zu erhalten. Zuletzt wird der p -Wert mit dem Signifikanzniveau α verglichen, wobei α frei wählbar ist. Je kleiner der p -Wert ist, umso geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die beiden zu prüfenden Verteilungen derselben Grundgesamtheit angehören. Wenn der p -Wert kleiner als das Signifikanzniveau ist, $p < \alpha$, wird die Nullhypothese verworfen, die beiden Verteilungen gehören dann nicht zur selben Grundgesamtheit. Für $p \geq \alpha$ wird die Nullhypothese angenommen und die beiden Verteilungen werden als nicht signifikant unterschiedlich bewertet.

In dieser Arbeit wird der Kolmogorow-Smirnow-Test^[87] und der Wilcoxon-Ranksum-Test^[88] angewendet. Letzterer wird auch Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, Mann-Whitney-U-Test oder vereinfacht U-Test genannt. Beide sind parameterfreie Signifikanztests, im Gegensatz zum bekannten T-Test^[89], welcher die Normalverteilung der Einzelverteilungen voraussetzt. Die Grundvoraussetzung, die bei allen Signifikanztests erfüllt werden muss, ist die statistische Unabhängigkeit aller Messwerte. Der Kolmogorow-Smirnow-Test verwendet den Mittelwert der Einzelverteilungen und der Wilcoxon-Ranksum-Test den Median der Einzelverteilungen, um eine Entscheidung bezüglich der Unterscheidbarkeit zu treffen. Für letzteren Test müssen die zu vergleichenden Größen identisch verteilt sein. Die Grundeinstellung für das Signifikanzniveau ist $\alpha = 0.05$. Wenn auch Unterschiede bei $\alpha = 0.01$ vorhanden sind, wird dieses Signifikanzniveau für die Diskussion der Ergebnisse verwendet. Im Allgemeinen wird das niedrigstmögliche Signifikanzniveau angegeben.

Teil II.

Zelluläre Reaktionen auf *in vivo* Stress

Motivation und Projektübersicht

Die folgenden Projekte befassen sich mit der Untersuchung von *in vivo* Stresszuständen in lebenden HeLa- und U2OS-Zellen im Hinblick auf die Wiedergabe der Zellreaktionen mit Hilfe verschiedener fluoreszenter Sensoren. Das Ziel ist die Charakterisierung und Bewertung der Sensoren bezüglich ihrer Sensitivität und damit der weiteren Verwendbarkeit für zukünftige Projekte. In diesem Zusammenhang sind die messbaren Größen die Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenzlebenszeit der jeweiligen Sensoren, siehe Kapitel 1.2. Konzeptionell werden drei Klassen an fluoreszenten Sensoren verwendet: ein molekularer Rotorfarbstoff [DASPMI], ein Redox-Sensor ohne nähere Spezifikation durch den Hersteller [CellRox-DeepRed] und ein FRET-Sensor [fCrH2].

Im Fokus dieses Projektes sind oxidativer Stress^{[90] [91] [92] [93]}, osmotischer Stress^{[94] [95] [96]} und chemotherapeutischer Stress^{[97] [98]}. Diese Auswahl an Stresskonditionen ist interessant, da osmotischer und oxidativer Stress in enger Verbindung mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson und einigen weit verbreiteten Zivilisationskrankheiten^{[99] [100] [101]} stehen. Außerdem verursacht die Behandlung mit Chemotherapeutika oxidativen Stress und beeinträchtigt damit die Mitosefähigkeit der Zellen. Alle untersuchten Stresskonditionen stören die Homöostase der Zellen auf eine spezifische Weise. Die beschriebenen Störungen können in dreierlei Zusammenhang betrachtet werden. Zum einen als Symptom bestimmter Krankheitsbilder, zweitens als Folge der Chemotherapie und schließlich als möglicher Parameter einer Gleichung, die das Kontinuum zwischen Leben und Tod beschreibt. Die Bedeutung der Stressszenarien für die medizinische und die biophysikalische Forschung wird am Anfang der jeweiligen Kapitel motiviert.

Oxidativer Stress wird entweder direkt, durch Zugabe von H_2O_2 (in HeLa-Zellen), oder indirekt durch Zugabe von Menadion (in HeLa- und U2OS-Zellen) hervorgerufen. Im ersten Fall wird die Wiedergabe des Stresszustandes durch DASPMI, im zweiten Fall durch CellRox-DeepRed geprüft.

Cisplatin wird in HeLa-Zellen als chemotherapeutisches Reagenz verwendet, um Unterschiede zwischen dem unbehandelten und behandelten Zellzustand über die Fluoreszenzlebenszeiten von DASPMI zu untersuchen. Dieses Kapitel befasst sich mit einer

alternativen Auswertung über Phasor. Die Messungen wurden, bis auf die Autofluoreszenzmessungen an Cisplatin, von Olivia Stiehl im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt.

Des Weiteren wird in Kapitel 6 der FRET-Sensor fCrH2 verwendet, um räumlich aufgelöst die Zunahme der Gedrängtheit in HeLa-Zellen nach der Behandlung mit hyperosmotischem Mikroskopiemedium mit spezifischer Osmolarität zu messen.

Tab. 3.1 fasst die Experimente dieser Projekte zusammen. Alle verwendeten Sensoren, Mess- und Auswertemethoden sowie Zelltypen sind nach Kapiteln aufgeführt. Zusätzlich zu den Stresszuständen wurde die Autofluoreszenz der Stressreagenzien *in vivo* geprüft.

Kapitel	Zelltyp	Stress	Reagenz	Sensor	Messung	Analyse
4	HeLa	Oxidativ Chemoth.	H ₂ O ₂ Cisplatin	DASPMI	FLIM*	Phasor
						Phasor
				- ohne -	FLIM	DE-Fit
				- ohne -	AF	DE-Fit
5	HeLa, U2OS	Oxidativ	Menadion	CellRox	FLPM	DE-Fit
					FLIM	DE-Fit,
						Phasor
				- ohne -	AF	E-Phasor
6	HeLa	HyperOsm.	NaCl	fCrH2	FLPM	DE-Fit

Tabelle 3.1.: Zusammenfassung der Experimente dieser Arbeit. Die Tabelle gibt eine Übersicht über die durchgeführten Experimente, die *in vivo* Bedingungen, die Reagenzien, Sensoren, die Messmethoden und die Auswertemethoden, die Bestandteil dieser Arbeit sind. Ein * markiert nicht selbst durchgeführte Messungen, zu denen im Rahmen dieser Arbeit eine alternative Auswertung über Phasor erstellt wurde. AF bezeichnet Messungen der Intensität der Autofluoreszenz und FLIM sowie FLPM die verwendeten Methoden zur Lebenszeitmessung. DE-Fit bezeichnet die Auswertung mittels doppelexponentieller Kurvenanpassung. E-Phasor ist die Abkürzung für die Zellensemble-Phasor Auswertung. Die Sensoren DASPMI (molekularer Rotor), CellRox-DeepRed (Redox-Sensor) und fCrH2 (*Crowding*-Sensor) wurden für die Untersuchung zellulärer Fluide verwendet. Cisplatin, Menadion, H₂O₂ und NaCl sind die Stressreagenzien für chemotherapeutischen, oxidativen und osmotischen Stress. In der Tabelle bedeuten Leerzeilen unterhalb eines Parameters, dass diese konstant gehalten wurde.

Molekularer Rotor als viskositätssensitiver Stresssensor

Ziel dieses Projektes ist es, über Phasor [Kapitel 3.2.3] eine alternative Auswertung zu vorhandenen FLIM-Experimenten zu zeigen, die Olivia Stiehl im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt hat. Hierbei wird DASPMI sowohl in seiner Rolle als Stresssensor für *screening*-Anwendungen als auch viskositätssensitiver molekularer Rotor für die bildgebende Zellkompartimentseparation untersucht.

Olivia Stiehls Resultate waren, dass DASPMI kompartimentspezifisch mit einer mittleren Lebenszeitverschiebung zu höheren Werten in zellulären Fluiden mit höherer Mikroviskosität reagiert, und dass diese Lebenszeiten durch Stressbehandlungen wie chemotherapeutischen Stress und oxidativen Stress zusätzlich zu höheren Werten verschoben werden. Die Mikroviskosität steht in engem Zusammenhang mit der Gedrängtheit^[102] zellulärer Fluide und ist damit ein Hinweis auf die beschleunigte oder verlangsamte Reaktionskinetik im untersuchten Medium. Das Chemotherapeutikum Cisplatin wirkt zytostatisch auf viele Krebsarten, indem es DNA-Quervernetzungen verursacht und damit die Apoptose bei schnellteilenden Zellen, wie Krebszellen, einleitet^[103]^[104]. Cisplatin verursacht darüber hinaus, wie auch das Stressreagenz H_2O_2 , oxidativen Stress^[97] und greift in die Homöostase lebender Zellen ein.

Die Bildgebung von zellulären Kompartimenten und Fluiden (*imaging*), wie auch ihre Reaktion auf verschiedene Stresszustände (*drug-screening*), ist wichtiger Bestandteil biophysikalischer Forschung.

Stringari et al.^[105] gelang es in diesem Zusammenhang, den Entwicklungszustand von *Caenorhabditis elegans*-Keimzellen über Phasor und FLIM zeitaufgelöst zu erfassen. Hierfür verwendeten sie die Häufigkeitscharakteristik der Phasor-Darstellung in Zusammenhang mit den spezifischen Lebenszeiten autofluoreszenter, intrazellulärer Fluorophore wie Collagen, Flavin, Porphyrin und einiger mehr. Gemessen an den unterschiedlichen Lebenszeiten der lokalen Autofluoreszenz zeigt die Produktion der verschiedenen Proteine eine größere oder geringere Häufigkeit im Phasorraum, die wieder-

um mit dem Entwicklungszustand der Zellen korreliert. Anhand dieser Informationen lässt sich das Zellstadium über die Darstellung seiner Lebenszeiten charakterisieren.

Eine weitere innovative Möglichkeit der Klassifikation von Zellen oder in Zukunft auch Zellkompartimenten ist in der Publikation von Christiansen et al.^[106] gezeigt. Dort wird mit Hilfe von *deep-learning* Algorithmen über die Strukturerkennung verschiedener Zelltypen und zellulärer Kompartimente deren Fluoreszenzmarkierung vorhergesagt.

Für die Bildgebung der Mitochondrien ist des Weiteren die Methode FaLM (*flicker assisted light microscopy*)^[107] geeignet. Diese verwendet spezielle Fluorophore, die durch die Fluktuation des mitochondrialen Membranpotentials auf kurzen Zeitskalen aktiviert und deaktiviert werden können und sich durch ein charakteristisches Flackern der Fluoreszenzintensität zeigen.

Mit Hilfe des K-Means-clustering-Algorithmus^[108] konnte Stiehl FLIM-Daten dazu verwenden, Zellbereiche bezüglich der gekoppelten Intensität und Lebenszeit der Fluoreszenz in verschiedene Klassen einzuteilen. Analog zum K-Means-Algorithmus wird am Beispiel von *Phasor-Slicing* eine Methode vorgeschlagen, die zur Identifikation zellulärer Kompartimente verwendet werden kann und auf der Funktionsweise von molekularen Rotoren beruht.

4.1. Materialien und Methoden

In diesem Abschnitt werden die Methoden vorgestellt, die im folgenden Projekt Anwendung finden. Dieses Projekt ist in Zusammenarbeit mit Olivia Stiehl entstanden, die FLIM Experimente an DASPMI-markierten HeLa-Zellen durchgeführt hat. Dabei wurden die Zustände: unbehandelt, Cisplatin-Behandlung und der oxidative Stresszustand, verursacht durch H_2O_2 , untersucht. Die Durchführung der FLIM-Experimente ist aus der Arbeit „*On the crowding state of cellular and biomimetic fluids*“^[1] von Olivia Stiehl entnommen und wird zitiert. Die Messungen zur Autofluoreszenz von Cisplatin [Kapitel 4.1.3] wurden nachträglich durchgeführt, um falsch-positive Resultate auszuschließen.

4.1.1. Zellbehandlung^[1]

HeLa-Zellen wurden gemäß den in Kapitel 2.1 beschriebenen Methoden kultiviert und den folgenden Abschnitten entsprechend mit Cisplatin oder H_2O_2 behandelt. Der molekulare Rotorfarbstoff DASPMI wurde von der Firma Sigma-Aldrich gekauft. Die Ensemblegröße beläuft sich auf $N_{\text{cell}} = 5$ physiologische, $N_{\text{cell}} = 8$ Cisplatin-behandelte und $N_{\text{cell}} = 6$ H_2O_2 -behandelte Zellen.

Chemotherapeutische Stressbehandlung

Für die chemotherapeutische Stressbehandlung wurden HeLa-Zellen für 20 h in einer Lösung aus Kulturmedium [DMEM] mit 14 μM Cisplatin bei 37 °C inkubiert. Die Färbung erfolgte mit 10 μM DASPMI in Kulturmedium für weitere 60 min. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

Oxidative Stressbehandlung

Für die oxidative Stressbehandlung wurden zwei Lösungen angefertigt, Lösung A: Kulturmedium mit 300 μM H_2O_2 und 10 μM DASPMI und Lösung B: Kulturmedium mit 10 μM DASPMI. HeLa-Zellen wurden zuerst für 30 min in Lösung B, nach Mediumwechsel für weitere 30 min in Lösung A inkubiert. Auf diese Weise konnten die Zellen für 60 min mit DASPMI und 30 min mit H_2O_2 behandelt werden. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und das Kulturmedium gegen Mikroskopiemedium mit 300 μM H_2O_2 getauscht.

4.1.2. FLIM-Experimente^[1]

FLIM-Experimente wurden gemäß Kapitel 3.1.1 mit folgenden Einstellungsparametern durchgeführt: Anregung durch gepulsten Laser mit der Wellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ und der Frequenz $f_{\text{ex}} = 40 \text{ MHz}$. Detektion im Wellenlängenbereich $\Delta\lambda_{\text{det}} = 500 - 550 \text{ nm}$ sowie $\Delta\lambda_{\text{det}} = 647 - 703 \text{ nm}$. Der kurzwellige Detektionsbereich wird im Folgenden „grüner Kanal“, der langwellige „roter Kanal“ genannt. Weitere Einstellungsparameter waren die Bildgröße: $N_x \times N_y = 512 \times 512$ und die Pixelgröße: $p_s = 120 \text{ nm}$. Die Messungen wurden entweder durch die maximale Photonenzahl $N_{\text{phot}} = 1500$ oder zeitlich durch die maximale Messdauer pro Zelle auf $T_{\text{mess}} = 7 \text{ min}$ begrenzt.

4.1.3. Autofluoreszenz-Messungen

Für die Cisplatin-Autofluoreszenzmessungen wurden HeLa-Zellen nach Kapitel 4.1.1 mit Cisplatin behandelt und ohne Färbung durch DASPMI gemessen. FLIM-Experimente nach Kapitel 3.1.1 wurden mit einem gepulsten Laser $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, $f_{\text{ex}} = 40 \text{ MHz}$ für $T_{\text{mess}} = 7 \text{ min}$ durchgeführt. Für diese Messungen wurde die höchstmögliche Laserintensität ohne signifikanten Bleicheinfluss verwendet, um sicherzustellen, dass der maximale Einfluss der Autofluoreszenz erfasst wird, und ein Vergleich zu den vorhandenen FLIM-Messungen möglich ist. Weitere Mikroskop-Einstellungen waren: Bildgröße: $N_x \times N_y = 512 \times 512$, Pixelgröße: $p_s = 190 \text{ nm}$, Pinhole: $\text{PH} = 2 \text{ AU}$, Abtastfrequenz: $f_{\text{scan}} = 400 \text{ Hz}$. Autofluoreszenz von H_2O_2 ist in den verwendeten Wellenlängenbereichen $\Delta\lambda_{\text{det}} = 500 - 550 \text{ nm}$ (grüner Kanal) und $\Delta\lambda_{\text{det}} = 647 - 703 \text{ nm}$ (roter Kanal) nicht zu erwarten und wurde nicht untersucht.

4.2. Sensorspezifische Stressantwort und Viskositätssensitivität

Wesentliche Ergebnisse

Die Grenzlebenszeiten von DASPMI ändern sich unter Stressbehandlung nicht signifikant, die Stressantwort des molekularen Rotors ist auf die Änderung fraktioneller Beiträge der Lebenszeiten beschränkt. In seiner Rolle als Stresssensor ist die Sensitivität von DASPMI auf oxidativen Stress in den Mitochondrien am höchsten. DASPMI weist den Mitochondrien die niedrigste, den Nukleoli die höchste Viskosität zu.

Im folgenden Abschnitt werden die Resultate der Phasor-Auswertung vorgestellt. Die Ergebnisse der Stressantwort werden nach Lebenszeiten und Lebenszeitfraktionen getrennt untersucht. In Kapitel 4.2.1 werden die Lebenszeiten τ_1 und τ_2 mit Hilfe der Phasor-Methode aus dem gesamten Zellbereich der FLIM-Messungen ermittelt. Im Anschluss folgt in Kapitel 4.2.2 die kompartimentspezifische Fraktionsanalyse der ausgewerteten Lebenszeiten. Hierbei wird die Spezifität von DASPMI auf Änderungen der Umgebungviskosität nach der Behandlung mit H_2O_2 und Cisplatin untersucht. Zuletzt wird in Kapitel 4.2.3 der Einfluss der Autofluoreszenz von Cisplatin auf die Ergebnisse quantifiziert.

4.2.1. Lebenszeitanalyse

Betrachtet man die Lebenszeiten τ_1 und τ_2 in der Phasordarstellung, also die Schnittpunkte der Regressionsgerade durch die Phasorwolke mit dem Universalhalbkreis, fällt auf, dass sich diese im Mittel in allen Behandlungsfällen nicht signifikant ändern. Tab. 4.1 zeigt die gemittelten Lebenszeiten $\langle\tau_1\rangle$ und $\langle\tau_2\rangle$ mit dem Fehler des Ensemblemittelwertes s_E je Behandlungszustand.

Die Verteilungen der mittleren zellspezifischen Lebenszeiten τ_i beider Behandlungsarten wurden über den Wilcoxon-Ranksum-Test bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0.01$ auf Übereinstimmung mit den Verteilungen der physiologischen Kondition geprüft. Der Test ergab, dass die Verteilungen der τ_i behandlungsübergreifend derselben Grundgesamtheit entstammen. Daher ist es gerechtfertigt, die jeweiligen Lebenszeiten über alle Behandlungszustände, physiologisch, Cisplatin-behandelt und H_2O_2 -behandelt zu mitteln und das Resultat mitsamt des Mittelwertsfehlers anzugeben. Die mittleren Lebenszeiten im grünen und im roten Kanal mit den entsprechen Indizes „g“ und „r“ sind in Gl. (4.1) gezeigt.

$$\begin{aligned}\tau_{1,g} &= 0.70 \pm 0.01 \text{ ns}, & \tau_{2,g} &= 2.55 \pm 0.02 \text{ ns} \\ \tau_{1,r} &= 1.16 \pm 0.01 \text{ ns}, & \tau_{2,r} &= 3.43 \pm 0.03 \text{ ns}\end{aligned}\tag{4.1}$$

DASPMI LEBENSZEITEN	grüner Kanal		roter Kanal	
	$\langle\tau_1\rangle \pm s_E$ [ns]	$\langle\tau_2\rangle \pm s_E$ [ns]	$\langle\tau_1\rangle \pm s_E$ [ns]	$\langle\tau_2\rangle \pm s_E$ [ns]
Physiologisch	0.69 ± 0.01	2.53 ± 0.03	1.14 ± 0.01	3.42 ± 0.01
Cisplatin	0.67 ± 0.01	2.58 ± 0.04	1.11 ± 0.01	3.37 ± 0.04
H ₂ O ₂	0.75 ± 0.02	2.55 ± 0.03	1.22 ± 0.02	3.52 ± 0.03

Tabelle 4.1.: Behandlungsspezifische Lebenszeiten von DASPMI in HeLa-Zellen. Die Tabelle zeigt die Übersicht über die drei behandlungsspezifischen Lebenszeiten im grünen ($\Delta\lambda_{\text{det}} = 500 - 550$ nm) und im roten ($\Delta\lambda_{\text{det}} = 647 - 703$ nm) Kanal. τ_1 und τ_2 bezeichnen dabei die Lebenszeiten, die über die Schnittpunkte der Phasorregressionsgerade mit dem Universalhalbkreis gewonnen werden. Die Fehlerangaben s_E sind der Fehler des Mittelwertes. Der Wilcoxon-Ranksum-Test bewertet die Lebenszeitverteilungen der Cisplatin-behandelten Zellen wie auch der H₂O₂-behandelten Zellen, je im Vergleich mit der Lebenszeitverteilung physiologischer Zellen als eine Grundgesamtheit bei dem Signifikanzniveau von $\alpha = 0.01$ im grünen wie auch im roten Kanal. Hier ist auch zu beobachten, dass die Fehler s_E der größeren Lebenszeit $\langle\tau_2\rangle$ systematisch größer als die der kleineren Lebenszeit $\langle\tau_1\rangle$ sind [Kapitel 3.2.5].

Die Erkenntnis dieser quantitativen Untersuchung ist, dass sich die Lebenszeiten von DASPMI, also die Relaxationszeiten der Moden, unter Stressbehandlung, nicht signifikant ändern. Dies ist ein Hinweis darauf, dass im Verhältnis zu den Lebenszeiten, die mit der intramolekularen Relaxation, ICTS und TICTS verbunden sind, das DASPMI-Molekül zu einem nicht signifikanten Anteil über Stoßrelaxationen (*quenching*) Energie an umgebende Moleküle überträgt. Die wesentlichen Auswerteparameter des molekularen Rotors in seiner Funktion als Stresssensor müssen also die Fraktionsbeiträge λ_i der Lebenszeiten τ_i sein. Dieser Untersuchung widmet sich der nächste Abschnitt.

4.2.2. Fraktionsanalyse

Im letzten Abschnitt wurde gezeigt, dass sich die Lebenszeiten τ_1 und τ_2 von DASPMI unter verschiedenen Behandlungen nicht signifikant ändern. Aus diesem Grund kann die Untersuchung des molekularen Rotors auf die Analyse der Lebenszeitfraktionen je Behandlungszustand und der Fraktionsverschiebungen unter Stresseinflüssen reduziert werden. Die behandlungs- und kompartimentspezifische Auswertung der häufigsten Lebenszeitfraktion $\lambda_{(g,r),\text{max}}$ im roten und grünen Kanal wird in diesem Kapitel erklärt und vorgestellt. Hierfür wird zuerst auf die Erstellung der Fraktionsverteilungen (Phasorschnitte) und im Anschluss auf die stressabhängige und die stressunabhängige Reaktion von DASPMI in den verschiedenen zellulären Kompartimenten eingegangen.

Fraktionsverteilungen und Phasorschnitte

Für die kompartimentspezifische Auswertung der Lebenszeitfraktionen müssen die pixelweisen Histogramme, die den verschiedenen Kompartimenten der Zelle zugehörig sind, für die Phasorauswertung mit Hilfe von Masken ausgewählt werden. Diese Auswahlmasken wurden von Olivia Stiehl im Rahmen ihrer Dissertation^[1] mit Hilfe des

K-Means-Algorithmus erstellt und separieren das Zellinnere in die Bereiche der Mitochondrien, des Zytoplasmas, des Nukleoplasmas und der Nukleoli. Abb. 4.1 zeigt das Resultat einer solchen Separation, mit der die erwähnten zellulären Kompartimente getrennt und mittels Phasor einzeln untersucht werden können.

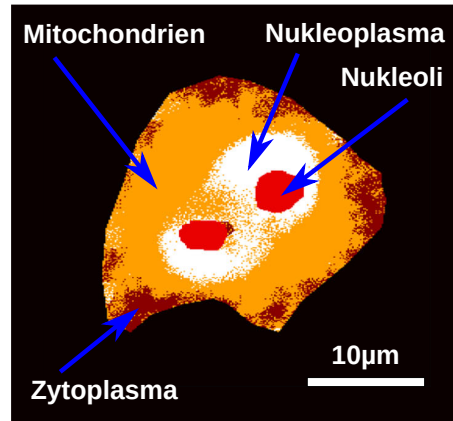


Abbildung 4.1.: K-Means-Zellkompartimentseparation. Gezeigt ist das Resultat einer Zellkompartimentseparation mit Hilfe des K-Means-Algorithmus. Diese Methode wurde in der Dissertation von Olivia Stiehl verwendet und ermöglicht die selektive Auswahl derjenigen Pixel für die Phasor-Auswertung, die den jeweiligen Kompartimenten zugeordnet werden. Braun ist das Zytoplasma, orange die Mitochondrien und weiß das Nukleoplasma gezeigt. Die Nukleoli werden rot hervorgehoben.

Um die fraktionellen Beiträge der Lebenszeiten τ_1 und τ_2 zu bestimmen, wird nach den, in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Methoden vorgegangen. Die Analyse muss für DASPMI nach Kanälen getrennt durchgeführt werden. Für die Fraktionsanalyse werden zunächst die den vier zellulären Kompartimenten zugewiesenen pixelweisen Histogramme in getrennten Phasor-Plots dargestellt. Im Anschluss wird eine Regressionsgerade je Zelle aus allen pixelweisen Histogrammen berechnet. Entlang dieser Regressionsgerade werden die einzelnen Phasorhistogramme der jeweiligen Kompartimente abgetastet. Für eine Zelle wird somit dieselbe Regressionsgerade zur Analyse der Lebenszeitfraktionen aller vier Kompartimente verwendet.

Nachdem für jede Zelle und alle vier Kompartimente der Länge nach normierte Phasorschnitte vorliegen, können diese kompartimentspezifisch über alle Zellen desselben Behandlungszustandes gemittelt werden. Die Ensemblegröße wird hierbei von der geringsten Zahl gemessener Zellen, dem physiologischen Zustand, bestimmt. Die je Zelle und je Kompartiment erstellten Phasorschnitte werden über fünf Zellen gemittelt, mit einem gleitenden Mittelwert $N_s = 5$ geglättet und auf den Maximalwert der Verteilung $p(\lambda_{\max})$ normiert. Im Folgenden wird die stressensitive Reaktion von DASPMI und die behandlungsunabhängige Unterscheidbarkeit der Kompartimentviskositäten beschrieben.

Stressantwort von DASPMI

In diesem Abschnitt wird die stressensitive Reaktion von DASPMI in physiologischen, Cisplatin-behandelten und H_2O_2 -behandelten HeLa-Zellen betrachtet. Dabei wird untersucht, wie die zellulären Kompartimente auf externen Stress reagieren und ob diese Einflüsse durch die Fraktionsanalyse von DASPMI unterscheidbar sind. Letztere Analyse wird mit Hilfe des Wilcoxon-Ranksum-Tests durchgeführt.

In Abb. 4.2 ist grau schattiert der mittlere Phasorschnitt $p(\lambda) = p(\lambda_1)$ der gesamten Zelle je Behandlungsart im grünen und roten Kanal zu sehen. Das Maximum der Phasorschnitte liegt bei physiologischen Zellen bei $\lambda_{(g,r),\max} \approx 0.75$ und verschiebt sich bei stressbehandelten Zellen zu kleineren λ . Dies ist äquivalent zu einer stärkeren Gewichtung der größeren Lebenszeit τ_2 und bedeutet, dass DASPMI auf die Änderung seines Umfeldes über die Zunahme seiner mittleren Lebenszeit $\langle \tau \rangle$ reagiert. Die Lebenszeiterhöhung deutet an, dass die Viskosität der zellulären Fluide unter Stressbehandlung im Mittel zunimmt. Die Viskositäts-erhöhung ist hier eine qualitativ aus der Fraktionsverringern und damit der mittleren Lebenszeiterhöhung abgeleitete Größe.

Die kompartimentspezifische Untersuchung der maximalen Lebenszeitfraktion $\lambda_{(g,r),\max}$ mit Hilfe des Wilcoxon-Ranksum-Tests [Tab. 4.2] zeigt, dass eine Fraktionsverschiebung unter Stressbehandlung im Nukleus, im Zytoplasma und den Nukleoli behandlungsübergreifend im Rahmen eines Signifikanzniveaus von bis zu $\alpha = 0.05$ nicht nachweisbar ist. Dies liegt an der Breite der Einzelverteilungen $p(\lambda)$ der kompartimentspezifischen Fraktionen [Abb. 4.2], da der Mittelwert $\lambda_{(g,r),\max}$ sich in fast allen Fällen durch die Cisplatin-behandlung und noch stärker durch die H_2O_2 -Behandlung verringert [Abb. 4.3]. Die Nukleoli im roten Kanal zeigen dagegen eine stärkere Fraktionsverschiebung durch die Cisplatin-Behandlung als durch die H_2O_2 -Behandlung und bilden damit die einzige Ausnahme von dieser Regel.

Die beiden auffallendsten Änderungen der Fraktionen können im mitochondrialen Bereich beobachtet werden: Zum Einen durch die H_2O_2 -Behandlung, welche bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ auftritt, und zum Anderen durch die Cisplatin-Behandlung, die sich im roten Kanal bereits bei $\alpha = 0.01$ zeigt, dafür im grünen Kanal ausbleibt. Dagegen zeigt sich im Rahmen dieser Untersuchung in keinem Kompartiment ein signifikanter Unterschied zwischen der Cisplatin-Behandlung und der H_2O_2 -Behandlung.

Viskositätssensitivität von DASPMI

Von der Stressbehandlung unabhängig zeigt DASPMI verschiedene Fraktionsbeiträge $\lambda_{(g,r),\max}$ der kleineren Lebenszeit τ_1 in den Mitochondrien, dem Zytoplasma, dem Nukleoplasma und den Nukleoli. Diese Eigenschaft charakterisiert DASPMI als viskositätssensitiven molekularen Rotor.

In diesem Abschnitt wird die Kompartimentviskosität mit dem Fraktionsbeitrag ver-

W-RS-TEST $\lambda_{(g,r),\max}$	grün			rot		
	P-C	P-H	C-H	P-C	P-H	C-H
Zytoplasma	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Nukleoplasma	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Nukleoli	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Mitochondrien	0/0	1/0	0/0	1/1	1/0	0/0

Tabelle 4.2.: Signifikanztest: Regionsspezifische Fraktionsverschiebungen der DASPMI-Lebenszeiten unter Stressbehandlung. Wilcoxon-Ranksum-Test für $\alpha = 0.05$ und $\alpha = 0.01$. Die Reihenfolge der Angabe ist „ $\alpha = 0.05/\alpha = 0.01$ “. Getestet wurde die Signifikanz der Verschiebung von $\lambda_{(g,r),\max}$ bei den verschiedenen Behandlungen. Signifikante und nicht signifikante Unterschiede sind durch boolesche Werte abgekürzt. **0:** Kein signifikanter Unterschied bei farblich zugehörigem α . **1:** Signifikanter Unterschied bei farblich zugehörigem α . Folgende Vergleiche sind gezeigt: **P-C:** Unbehandelt - Cisplatin-behandelt, **P-H:** Unbehandelt - H_2O_2 -behandelt, **C-H:** Cisplatin-behandelt - H_2O_2 -behandelt. Einheitlich im grünen und roten Kanal sind die statistisch signifikanten Fraktionsverschiebungen durch die Behandlung mit H_2O_2 in den Mitochondrien bei $\alpha = 0.05$ zu sehen. Der stärkste Unterschied der Fraktionsmaxima $\lambda_{r,\max}$ ist im roten Kanal zwischen dem physiologischen und dem Cisplatin-behandelten Zustand bereits bei $\alpha = 0.01$ zu sehen. Zwischen dem Cisplatin-behandelten und dem H_2O_2 -behandelten Zustand ist weder im grünen noch im roten Kanal ein signifikanter Unterschied über die Auswertung der Phasorschnitte feststellbar.

knüpft. Dadurch können Kompartimenten mit niedrigem $\lambda_{(g,r),\max}$ hohe mittlere Lebenszeiten und damit hohe Viskositäten zugeordnet werden. An dieser Stelle ist noch unklar ob die Wiedergabe der umgebenden Fluidviskosität durch DASPMI in beiden Kanälen einheitlich ist. Vorerst wird deshalb auf die Angabe tatsächlicher Viskositätsverhältnisse verzichtet und stattdessen die „scheinbare“ Kompartimentviskosität diskutiert. Aus Abb. 4.3 (grüner Kanal) kann nun die folgende Ordnung der scheinbaren Kompartimentviskositäten Γ_g abgelesen werden:

$$\Gamma_{g,Nukleoli} > \Gamma_{g,Nukleoplasma} > \Gamma_{g,Zytoplasma} > \Gamma_{g,Mitochondrien}.$$

Im roten Kanal tauschen Nukleoplasma und Zytoplasma ihre Rollen, die Grenzfälle, dass die Nukleoli die höchste scheinbare Viskosität und die Mitochondrien die geringste zeigen, bleiben aber gleich. Aus Abb. 4.3 (roter Kanal) kann folgende Ordnung der scheinbaren Kompartimentviskositäten Γ_r aus den maximalen Fraktionen $\lambda_{r,\max}$ abgelesen werden:

$$\Gamma_{r,Nukleoli} > \Gamma_{r,Zytoplasma} > \Gamma_{r,Nukleoplasma} > \Gamma_{r,Mitochondrien}.$$

Die Fraktionen $\lambda_{(g,r),\max}$ zeigen im grünen wie auch im roten Kanal einheitlich, dass die Mitochondrien von den untersuchten Zellkompartimenten die geringste und die Nukleoli die höchste scheinbare Viskosität aufweisen. Daher kann geschlossen werden, dass für diese beiden Kompartimente die Ordnung der scheinbaren Viskositäten Γ mit der tatsächlichen Viskositätsordnung übereinstimmt. Da die Fraktionen $\lambda_{g,\max}$ und $\lambda_{r,\max}$ im Nukleoplasma und im Zytoplasma entgegengesetztes Verhalten zeigen, können diese Kompartimente bezüglich ihrer Viskosität lediglich zwischen den Mitochondrien und den Nukleoli eingeordnet, im Rahmen dieser Untersuchung jedoch nicht näher unter-

schieden werden.

Beide Eigenschaften von DASPMI, sowohl die gleiche Reaktion in den Nukleoli und den Mitochondrien im grünen und roten Kanal als auch die unterschiedliche Reaktion im Zytoplasma und Nukleoplasma in beiden Kanälen, können genutzt werden, um mit Hilfe der Phasordarstellung einen Algorithmus zur Zellkompartimentseparation zu entwickeln. Diese Idee wird im nächsten Kapitel verfolgt und umgesetzt.

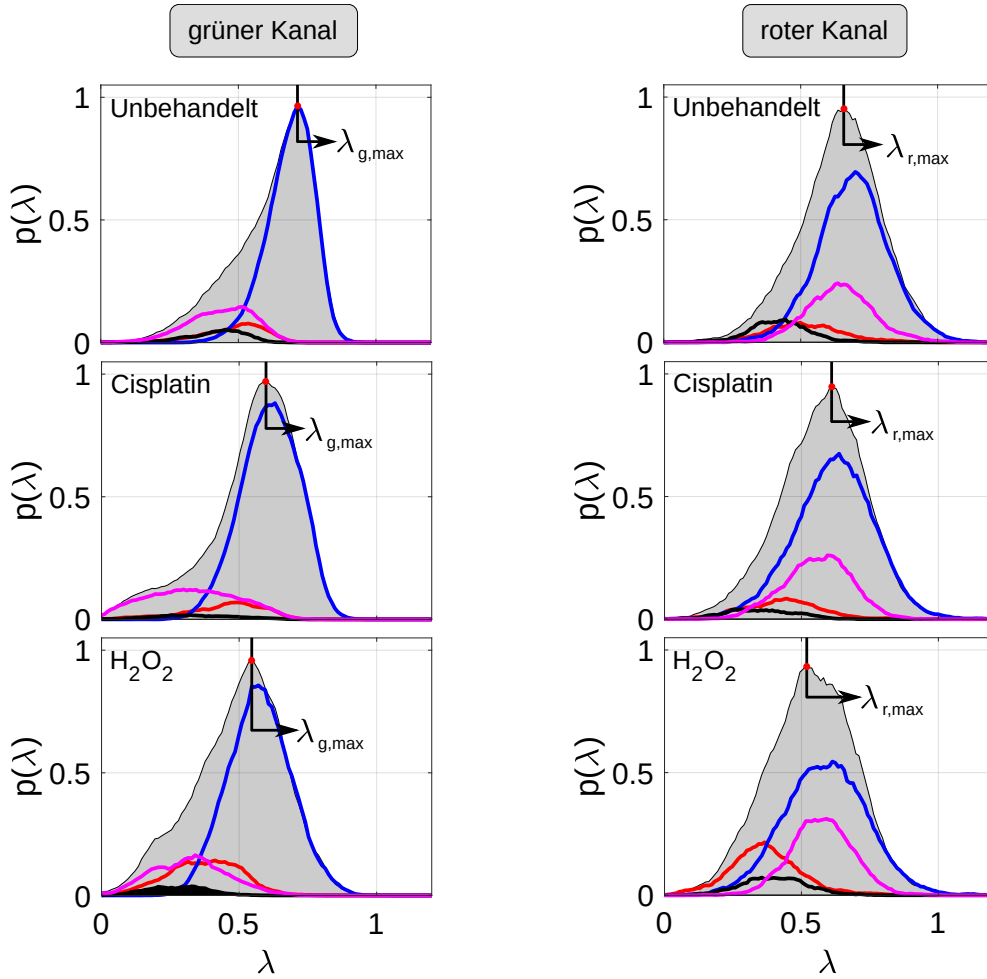


Abbildung 4.2.: Phasorschnitte entlang der Regressionsgerade. Gezeigt sind die über fünf Zellen gemittelten und mit dem Glättungsfaktor $N_s = 5$ geglätteten Schnitte durch die Phasorwolken entlang der Regressionsgerade. Die Phasorschnitte stellen die Verteilungen der Fraktion $\lambda = \lambda_1$ der Lebenszeit τ_1 entlang der Verbindungslinie zwischen τ_1 und τ_2 im Phasorplot dar. **Links:** Grüner Kanal: $\Delta\lambda_{\text{det}} = 500 - 550 \text{ nm}$, **Rechts:** Roter Kanal: $\Delta\lambda_{\text{det}} = 647 - 703 \text{ nm}$. Die kompartimentspezifischen Phasordarstellungen für die Phasorschnitte wurden mit Hilfe von Regionsmasken erstellt, die durch den K-Means-Algorithmus bestimmt wurden. Diese kompartimentspezifischen Masken sind in Abb. 4.1 durch die verschieden eingefärbten Kompartimente gezeigt. Die gezeigten Phasorschnitte sind farblich nach Kompartimenten markiert. Zytoplasma: rot, Mitochondrien: blau, Nukleoplasma: magenta, Nukleoli: schwarz. Grauschattiert ist das Gesamtprofil, also die Summe aller Phasorschnitte, gezeigt. Die häufigste Fraktion, $\lambda_{g,\text{max}}$ und $\lambda_{r,\text{max}}$, ist durch das Maximum der Fraktionsverteilungen gegeben. $\lambda_{g,\text{max}}$ und $\lambda_{r,\text{max}}$ verschiebt sich unter Cisplatin- wie auch H_2O_2 -Behandlung zu kleineren Werten. Dies ist äquivalent zu einer Erhöhung der mittleren Lebenszeit $\langle\tau\rangle$.

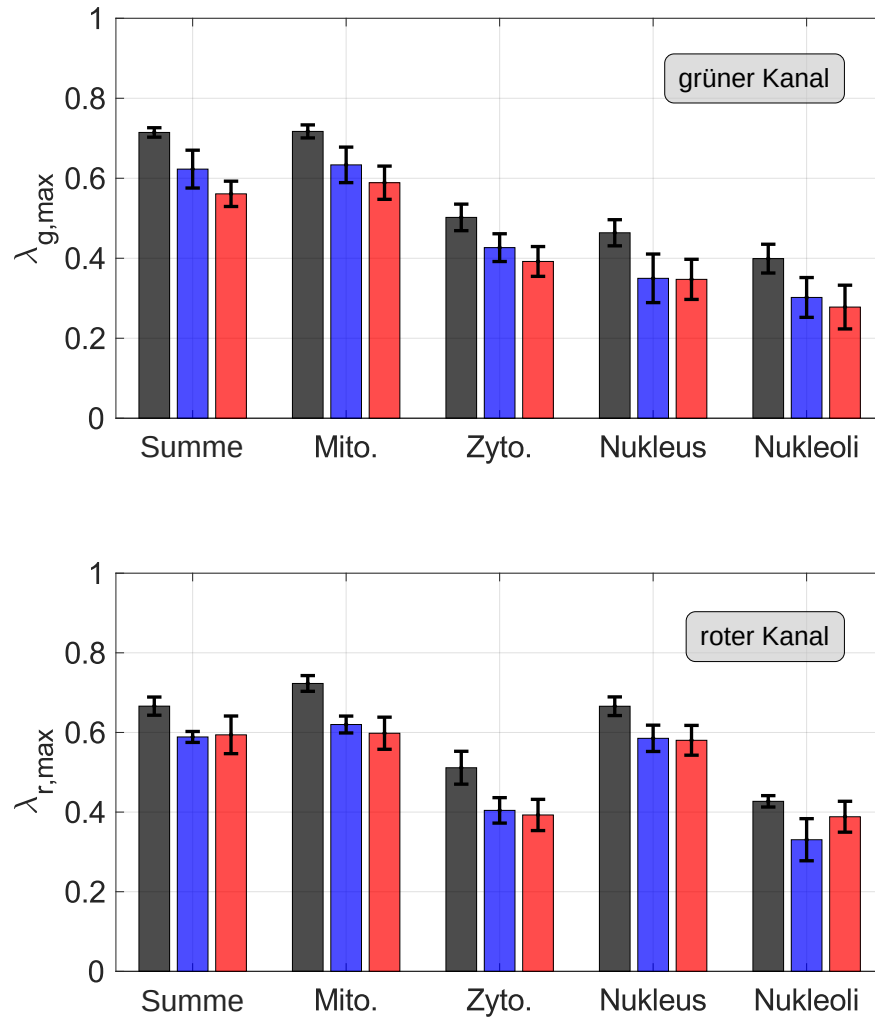


Abbildung 4.3.: DASPMI-Lebenszeitfraktionen aller Behandlungsarten. Gezeigt ist die regionsspezifische Positionsauswertung der häufigsten Lebenszeitfraktion $\lambda_{(g,r),max}$. Die Verringerung der gezeigten Fraktionen bedeutet eine stärkere Gewichtung der größeren Lebenszeit τ_2 gegenüber der kleineren Lebenszeit τ_1 . **Oben:** $\lambda_{g,max}$ im grünen Kanal ($\Delta\lambda_{det} = 500 - 550$ nm). **Unten:** $\lambda_{r,max}$ im roten Kanal ($\Delta\lambda_{det} = 647 - 703$ nm). Die Fehlerbalken sind der Fehler des Mittelwertes s_E über $N_{cell} = 5$ Zellen. Das Balkendiagramm ist nach den Zellregionen Mitochondrien (Mito.), Zytoplasma (Zyto.), Nukleoplasma (Nukleus), Nukleoli und der Summe all dieser in je drei Säulen, den Behandlungszuständen entsprechend, unterteilt: Unbehandelt: **schwarz**, Cisplatin-behandelt: **blau** und H_2O_2 -behandelt: **rot**. Im Mittel reagiert DASPMI auf alle Behandlungsarten mit einer Erhöhung seiner mittleren Lebenszeit $\langle\tau\rangle$. Im grünen Kanal zeigt sich konsistent, in allen Kompartimenten, die Verschiebung der häufigsten Fraktion $\lambda_{g,max}$ in Richtung der größeren Lebenszeit τ_2 unter Stressbehandlung. Die Verschiebung zur größeren Lebenszeit bezüglich des physiologischen Zustands ist am stärksten bei der H_2O_2 -Behandlung, gefolgt von der Cisplatin-Behandlung. Die Tendenz zur größeren Lebenszeit τ_2 kann für jeden Behandlungszustand nach Kompartimenten geordnet werden. Die höchste aus den Fraktionen ableitbare mittlere Lebenszeit $\langle\tau\rangle$ zeigen die Nukleoli, gefolgt vom Nukleoplasma, danach das Zytoplasma und an letzter Stelle die Mitochondrien. Im roten Kanal ist die behandlungsspezifische Ordnung bei den Nukleoli und in der Summe der Phasorschnitte gebrochen, dort sind die Verschiebungen bei den Cisplatin-behandelten Zellen am stärksten. Auch die Reihenfolge der mittleren Lebenszeit $\langle\tau\rangle$ ist eine andere. Nukleoli und Mitochondrien besetzen hier ebenfalls das größte und kleinste $\langle\tau\rangle$, das Zytoplasma und das Nukleoplasma tauschen aber ihre Position.

4.2.3. Autofluoreszenz von Cisplatin

Im letzten Kapitel wurde der größte über die Phasorschnitte nachweisbare Einfluss auf zelluläre Fluide durch die Cisplatin-Behandlung in den Mitochondrien ermittelt. Während signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten und stressbehandelten Zellen ausschließlich in den Mitochondrien ab einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ nachgewiesen werden konnten, war durch die Cisplatin-Behandlung eine signifikante mittlere Lebenszeiterhöhung bereits ab $\alpha = 0.01$ im roten Kanal vorhanden.

Cisplatin wirkt über die Quervernetzung doppelhelikaler DNA und mtDNA (*mitochondrial DNA*)-Stränge^{[109][104][110]}. Durch diese Kopplung könnte das Fluoreszenzspektrum des DNA-Cisplatin- und mtDNA-Cisplatin-Konstruktes die DASPMI-Fluoreszenz im grünen und roten Kanal verfälscht haben. Um die Möglichkeit der Verfälschung auszuschließen und den Einfluss der Autofluoreszenz zu quantifizieren, wurden Autofluoreszenz-Experimente [Kapitel 4.1.3] an Cisplatin-behandelten Zellen ohne DASPMI-Färbung durchgeführt. Insgesamt wurden $N_{\text{cell,AF}} = 11$ Zellen nach der Cisplatin-Behandlung gemessen. Sowohl die Lebenszeiten $\tau_{1,2}$ als auch die Intensität F des autofluoreszenten Cisplatin werden ausgewertet und mit Hilfe verschiedener Modelle der Einfluss der Autofluoreszenz auf die DASPMI-Lebenszeiten untersucht.

Lebenszeitcharakteristik der Autofluoreszenz

Zur Bestimmung der Lebenszeiten des autofluoreszenten Cisplatins ist es nicht möglich, räumliche Unterscheidungen zwischen Zellkompartimenten zu treffen, da hierfür das SNR des Nukleoplasmas nicht ausreicht. Deshalb wird pro Zelle und Kanal je ein Histogramm erstellt und dieses mittels doppel-exponentieller Kurvenanpassung [Kapitel 3.2.2] ausgewertet. Man erhält die Lebenszeiten in Gl. (4.2) mit den Indizes „g“ im grünen und „r“ im roten Kanal.

$$\begin{aligned}\tau_{1,g} &= 0.47 \pm 0.01 \text{ ns}, & \tau_{2,g} &= 2.53 \pm 0.02 \text{ ns}, \\ \tau_{1,r} &= 0.44 \pm 0.01 \text{ ns}, & \tau_{2,r} &= 1.97 \pm 0.03 \text{ ns}.\end{aligned}\tag{4.2}$$

Die kleinere Lebenszeit τ_1 des autofluoreszenten Cisplatin ist im grünen und roten Kanal sehr ähnlich, die größere Lebenszeit τ_2 unterscheidet sich um $\Delta\tau_{2,[g-r]} \approx 0.5 \text{ ns}$ zwischen den Kanälen. Im Vergleich mit den mittleren kombinierten Lebenszeiten von Cisplatin und DASPMI [Tab. 4.1] sind die Lebenszeiten des autofluoreszenten Cisplatin geringer. Dies gilt jedoch unter Vorbehalt, da die Phasor-Methode durch den notwendigen Einsatz des Glättungsfaktors N_s prinzipiell größere Lebenszeiten als die Auswertung über die doppel-exponentielle Kurvenanpassung ergibt.

Falls jedoch eine Verfälschung der vorhandenen FLIM-Messungen an Cisplatin-behandelten Zellen durch die Autofluoreszenz vorhanden ist, müssen diese Messungen gegenüber den Messungen an physiologischen Zellen in beiden Kanälen kleinere Lebenszeiten aufweisen. In Kapitel 4.2.1 sieht man, dass tatsächlich die Lebenszeiten $\tau_{1,2,g,r}$ der Cisplatin-behandelten Zellen um etwa 0.02–0.04 ns kleiner sind als die Lebenszeiten der

unbehandelten Zellen. Dieser Unterschied ist jedoch mit Hilfe des Wilcoxon-Ranksum-Tests als nicht signifikant bewertet worden. Um den Einfluss der Autofluoreszenz auszuschließen, wird im nächsten Kapitel deren Einfluss auf die gemessene Gesamtintensität untersucht.

Einfluss der Autofluoreszenz auf die Gesamtintensität

Für die Intensitätsuntersuchung der Autofluoreszenz können mit Hilfe der Durchlichtbilder die Nukleoplasma-region (Nukleoplasma und Nukleoli) und die Zytoplasmaregion (Zytoplasma und Mitochondrien) getrennt untersucht werden. Die folgende Beschreibung wird sowohl auf die Nukleoplasma-region als auch auf die Zytoplasmaregion angewendet.

Der Intensitätswert F pro Pixel ergibt sich jeweils aus dem Integral über das zugehörige Ankunftszeithistogramm. Für jede der $N_{\text{cell,AF}} = 11$ Zellen existiert regionsspezifisch der pixelweise Mittelwert μ_C und die zugehörige Standardabweichung σ_C . Der Index „C“ bezeichnet die Mittelung über eine Region pro Zelle. Mittelt man weiterhin über alle Zellen, erhält man den Ensemblemittelwert der Autofluoreszenz je Pixel und Region ξ_E und die mittleren Standardabweichungen ζ_E . Der Index „E“ bezeichnet die Mittelung über das Zellensemble. ξ_E und ζ_E haben ebenfalls eine Standardabweichung, σ_{ξ_E} und σ_{ζ_E} . Genannte Größen sind in Gl. (4.3) aufgeführt.

$$\begin{aligned}\mu_C &= \langle F \rangle_C, & \sigma_C \\ \xi_E &= \mu_{\mu_{CE}} = \langle \langle F \rangle_C \rangle_E, & \sigma_{\xi_E} \\ \zeta_E &= \mu_{\sigma_{CE}}, & \sigma_{\zeta_E}\end{aligned}\tag{4.3}$$

Fasst man die Standardabweichung der Autofluoreszenz je Zelle σ_C , die Standardabweichung des Ensemblemittelwertes der Autofluoreszenz über alle Zellen σ_{ξ_E} und die Standardabweichung der Standardabweichungen über alle Zellen σ_{ζ_E} zusammen, lässt sich der kumulative Fehler δ_K [Gl. (4.4)] definieren. Diese gibt die größtmögliche Abweichung der Autofluoreszenzintensität von ξ_E an.

$$\delta_K = \sigma_C + \sigma_{\xi_E} + \sigma_{\zeta_E}\tag{4.4}$$

Berechnet man die Größen in Gl. (4.3) auch für FLIM-Daten, deren Fluoreszenzsignal eine Kombination aus DASPMI-Fluoreszenz und Cisplatin-Autofluoreszenz ist, kann die kombinierte Fluoreszenz-Autofluoreszenz und Autofluoreszenz in Abb. 4.4 gezeigt werden. Um den Einfluss der Autofluoreszenz auf die FLIM-Daten zu quantifizieren, werden zwei Modelle R_1 und R_2 [Gl. (4.5)] verwendet. Das Modell R_1 zeigt den mittleren Einfluss der Autofluoreszenz gegenüber der kombinierten Fluoreszenz-Autofluoreszenz. Das Modell R_2 zeigt den maximal möglichen Einfluss der Autofluoreszenz mit dem kumulativen Fehler δ_K .

$$R_1 = \frac{(\xi_E)_{\text{AF}}}{(\xi_E)_{\text{F}}}, \quad R_2 = \frac{(\xi_E + \delta_K)_{\text{AF}}}{(\xi_E - \delta_K)_{\text{F}}}.\tag{4.5}$$

Abb. 4.4 zeigt die Ergebnisse der Modellbetrachtungen R_1 und R_2 . Der mittlere Einfluss R_1 der Autofluoreszenz von Cisplatin ist nicht signifikant. Der maximale Einfluss R_2 könnte die kombinierten Lebenszeiten der DASPMI-Fluoreszenz und Cisplatin-Autofluoreszenz verringern. R_2 zeigt im grünen Kanal den größten Einfluss der Autofluoreszenz, im roten Kanal kann die Autofluoreszenz generell vernachlässigt werden. Betrachtet man die Lebenszeiten von DASPMI bei physiologischen und Cisplatin-behandelten Zellen im grünen Kanal [Tab. 4.1], fällt auf, dass diese im Rahmen ihrer Fehler übereinstimmen. Ein messbarer Einfluss auf die vorhandenen FLIM-Messungen durch die Autofluoreszenz von Cisplatin kann deshalb ausgeschlossen werden.

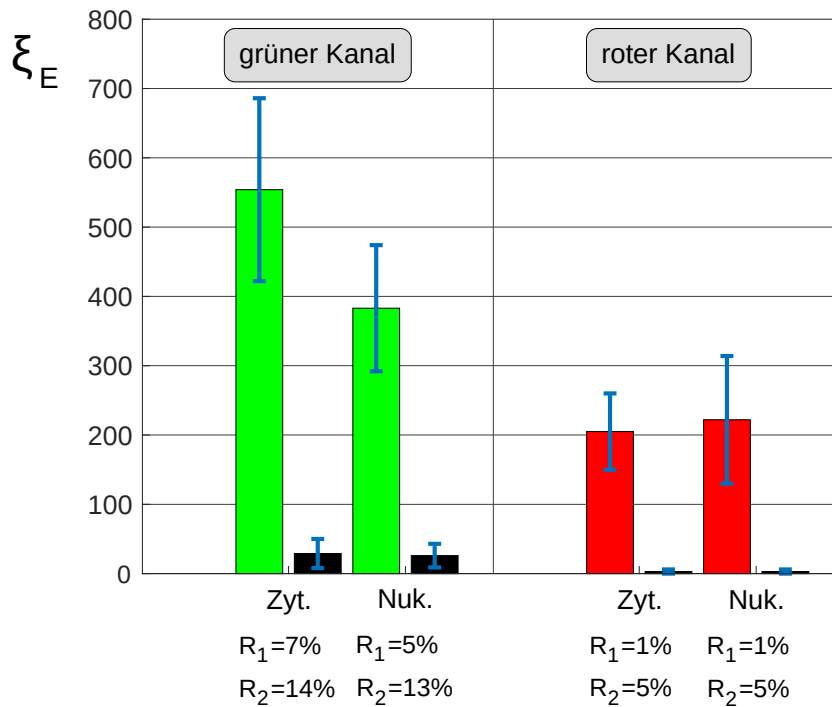


Abbildung 4.4.: Intensitätsanalyse der Cisplatin Autofluoreszenz. Gezeigt ist die regionsspezifische kombinierte pixelweise Fluoreszenz (DASPMI-Fluoreszenz + Cisplatin-Autofluoreszenz) und Cisplatin-Autofluoreszenz ξ_E im grünen und roten Kanal: **Zyt.:** Zytoplasmaregion, **Nuk.:** Nukleoplasmaregion. Zum Ensemble der kombinierten Cisplatin-Autofluoreszenz und DASPMI-Fluoreszenz haben $N_{\text{cell},F} = 8$ Zellen beigetragen. Die schwarzen Balken jeweils rechts neben den grünen und roten zeigen die mittlere pixelweise Autofluoreszenz von $N_{\text{cell},AF} = 11$ Cisplatin-behandelten Zellen ohne DASPMI-Färbung. Die Intensität der kombinierten Fluoreszenz im grünen Kanal ist in der Nukleoplasmaregion $\sim 30\%$ geringer als in der Zytoplasmaregion. Im roten Kanal ist die Intensität der Fluoreszenz in der Nukleoplasmaregion $\sim 5\%$ höher als in der Zytoplasmaregion. Die Autofluoreszenz ξ_E ist im grünen Kanal deutlich größer als im roten Kanal und in der gesamten Zellregion je Kanal sehr ähnlich. Dies zeigt eine größtenteils einheitliche Verteilung von Cisplatin in der Zytoplasma- und der Nukleoplasmaregion. Die Fehlerbalken zeigen den kumulativen Fehler δ_K [Gl. (4.4)]. Gezeigt sind auch die numerischen Ergebnisse der Autofluoreszenzuntersuchung über die Fallbetrachtungen R_1 und R_2 . Im roten Kanal ist der Einfluss konsistent geringer als im grünen Kanal. Während die Bewertung über R_1 keinen signifikanten Einfluss nahelegt, könnte nach R_2 eine Verfälschung der kombinierten DASPMI-Lebenszeiten möglich sein.

4.3. Kompartimentseparation mittels molekularer Rotoren

Wesentliche Ergebnisse

Phasor-Slicing ermöglicht die Einteilung des Zellinneren mit Hilfe des molekularen Rotors DASPMI in drei verschiedene Gebiete. Verschiedene Bereiche des Phasorraumes können den Mitochondrien, dem Nukleoplasma und den Nukleoli zugeordnet werden. Die Methode verwendet die Fraktion der DASPMI-Lebenszeiten als einziges Separationskriterium.

In Kapitel 4.2.2 wurde gezeigt, dass die Maxima der Fraktionsverteilungen von DASPMI in den vier verschiedenen Kompartimenten, dem Zytoplasma, den Mitochondrien, dem Nukleoplasma und den Nukleoli bei verschiedenen $\lambda_{(g,r),\max}$, aber gleichen mittleren Lebenszeiten τ_1 und τ_2 liegen [Kapitel 4.2.1]. Das heißt, die Kompartimente ordnen sich in der Phasorwolke entlang der Regressionsgerade an. In der Fraktionsanalyse wurde die unterschiedliche Fraktionsgewichtung der Kompartimente mit der Viskositätssensitivität von DASPMI erklärt. Übernimmt man die Ordnung der Fraktionsmaxima aus Kapitel 4.2.2 und bildet diese in einer Phasorskizze ab, ergibt sich Abb. 4.5.

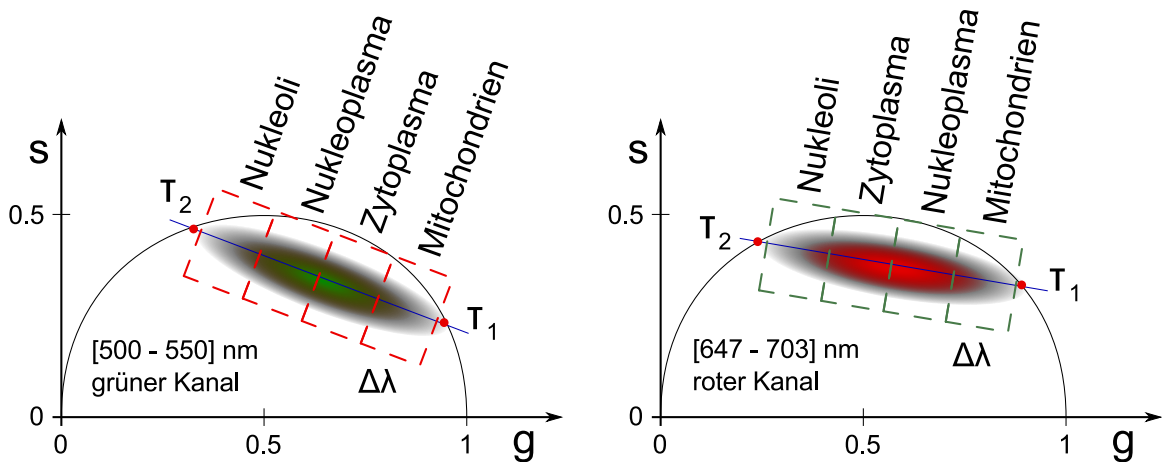


Abbildung 4.5.: Phasor-Slicing-Idee. Gezeigt ist die Anordnung der Zellkompartimente in der Phasorwolke. In der Skizze werden je Kompartiment gleich breite Fraktionsbeiträge $\Delta\lambda$ zur Darstellung verwendet. Im roten Kanal ist die Anordnung der Kompartimente ähnlich zum grünen Kanal, mit dem Unterschied, dass Zytoplasma und Nukleoplasma ihre Positionen tauschen. Sowohl die Gemeinsamkeiten als auch die Unterschiede beider Kanäle werden von dem *Phasor-Slicing*-Algorithmus genutzt, um die Mitochondrien, das Nukleoplasma und die Nukleoli anhand ihrer Position in der Phasorwolke zu identifizieren. Nach der Zuweisung können die kategorisierten Phasorpunkte im Bildraum unterschiedlich eingefärbt werden und zeigen Position und Größe der Kompartimente.

In diesem Kapitel werden die unterschiedlichen Fraktionsgewichtungen von DASPMI in den Zellkompartimenten ausgenutzt, um die Phasorwolken des grünen und roten

Kanals an spezifischen Stellen zu trennen, und einen Algorithmus zu entwickeln, der die jeweiligen Phasorpunkte mit den Zellkompartimenten verknüpft. Dieser Separationsalgorithmus ist im „Journal of Fluorescence“ publiziert.

Da DASPMI auf zelluläre Umgebungsfaktoren wie Polarität^[59] und Viskosität^[57] vom Behandlungszustand unabhängig mit einer Fraktionsverschiebung reagiert^[111]^[58], entstand die in diesem Abschnitt verfolgte Idee, Zellkompartimente mit Hilfe der Darstellung im Phasorraum voneinander zu trennen und einen Algorithmus zu entwickeln, der speziell auf molekulare Rotoren ausgelegt ist. Die Ordnung der Zellkompartimente im Phasorraum ist in Abb. 4.5 gezeigt. In diesem Kapitel wird die *Phasor-Slicing*-Methode vorgestellt, einige mit DASPMI gefärbte und aus den Fraktionsbeiträgen rekonstruierte HeLa-Zellen gezeigt und die Sensitivität wie auch die Fehleranfälligkeit der Methode untersucht.

4.3.1. *Phasor-Slicing*

Die Punkte im Phasorraum sind mit jenen im Bildraum über die FT des jeweiligen Histogramms verknüpft. *Phasor-Slicing* verwendet für die Gebietstrennung im Bildraum eine Zweiteilung der Phasorwolke im Phasorraum sowohl im grünen als auch im roten Kanal. Theoretisch könnte jeder Kanal für die Unterteilung in je vier Gebiete, wie in Abb. 4.5 gezeigt, verwendet werden. Allerdings sind die Verteilungen der Einzelkompartimente breit gegenüber den Fraktionsunterschieden [Abb. 4.2], weshalb je Kanal höchstens zwei Bereiche der Phasorwolke für *Phasor-Slicing* verwendet werden können.

Die Segmentierung der Phasorwolke ist aufgrund des starken Überlapps der Kompartimentspezifischen Phasorschnitte rein phänomenologisch. Die Identifikation der Zellkompartimente und deren Lokalisation ist sowohl durch Erfahrung als auch durch die Publikation von Ramadass et al.^[111] möglich, der die kompartimentspezifische Reaktion von DASPMI im Rahmen seiner Dissertation^[61] untersucht hat.

Abb. 4.6 zeigt das Vorgehen bei *Phasor-Slicing*. Der Separationsalgorithmus verwendet von den acht möglichen Gebieten, vier je Kanal, insgesamt nur drei: beide Gebiete im grünen Kanal, **A** und **B**, und überwiegend kleine Lebenszeitfraktionen im roten Kanal, **C**. Der Index „g“ bezeichnet den grünen Kanal und „r“ den roten Kanal.

Zunächst wird die Phasorwolke im grünen Kanal entlang der Regressionsgerade $p_g(\lambda)$ auf diejenigen $\lambda_{p_{g,u}}$ und $\lambda_{p_{g,o}}$ (von kleinen ($\lambda = 0$) zu großen ($\lambda = 1$) aufsteigend) abgetastet, für die Gl. (4.6) gilt. Der Index „u“ bezeichnet den unteren Häufigkeitswert und „o“ den oberen Häufigkeitswert entlang p_g , die für die Gebietstrennung im Phasorraum verwendet wird.

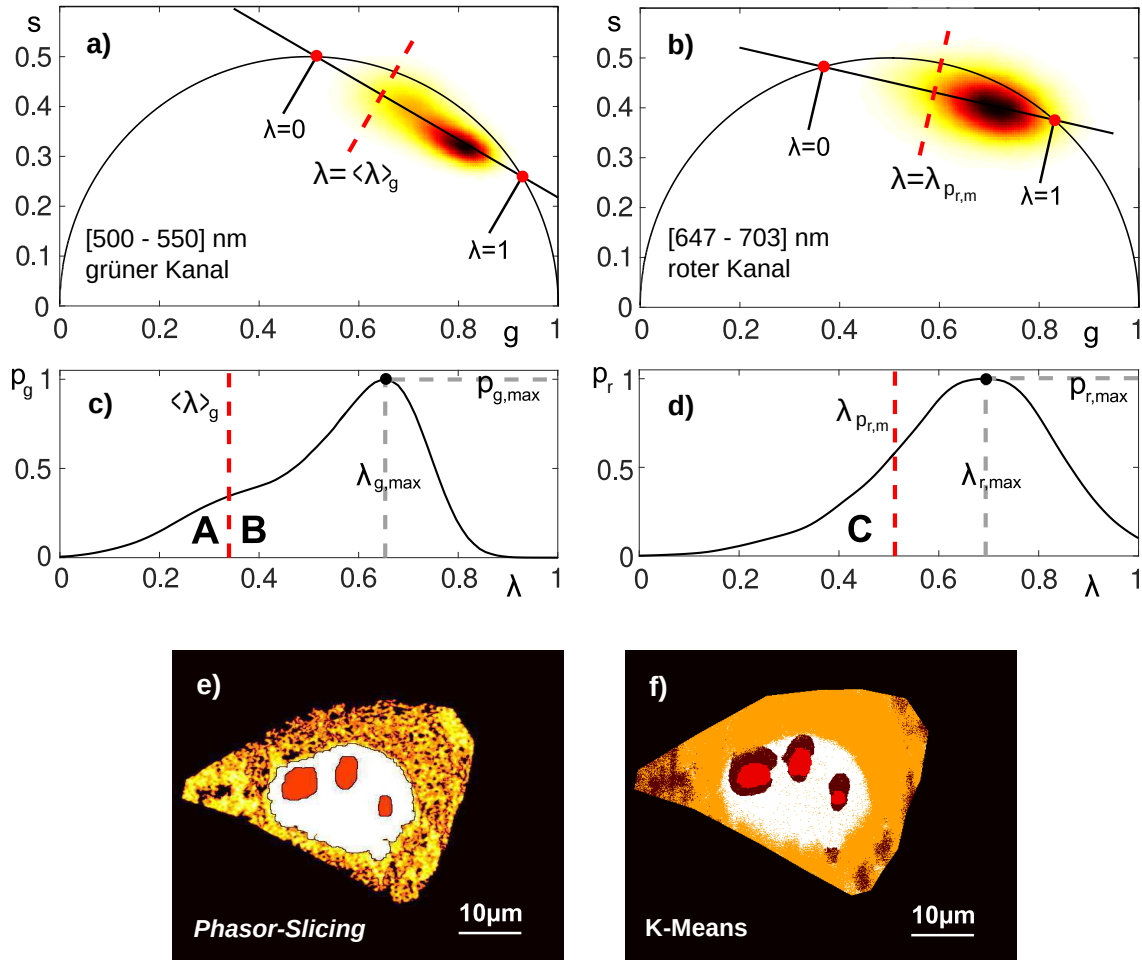


Abbildung 4.6.: Die Phasor-Slicing Methode. Gezeigt ist die Bildrekonstruktion über die Separation der Phasorgebiete. **a)** grüner Kanal ($\Delta\lambda_{\text{det}} = 500 - 550 \text{ nm}$) und **b)** roter Kanal ($\Delta\lambda_{\text{det}} = 647 - 703 \text{ nm}$) zeigen die Repräsentationen der FLIM-Bilder im Phasorraum mit der eingezeichneten Regressionsgerade, die an der Stelle $\lambda = 1$ den Halbkreis für τ_1 und an der Stelle $\lambda = 0$ denselben für τ_2 schneidet. Für λ gilt bei dieser Normierung $\lambda = \lambda_1$. **c)** und **d)** sind die entsprechenden Schnitte durch die Häufigkeitsverteilungen der Phasorpunkte in **a)** und **b)**. $\lambda_{(g,r),\text{max}}$ sowie $p_{(g,r),\text{max}}$ markieren die häufigste Lebenszeitkomposition zwischen τ_1 und τ_2 . Über eine phänomenologische Separation, gezeigt durch die rote gestrichelte Linie in **c)** $\langle\lambda\rangle_g$ und **d)** $\lambda_{p_{r,m}}$ ist es möglich, die HeLa-Zellen in drei relevante Bereiche einzuteilen: das Nukleoplasma, **A**, das Zytoplasma, **B** und die Nukleoli, **C**. **e)** Überlagerung der drei mittels *Phasor-Slicing* getrennten Regionen. **f)** K-Means-Resultat der Kompartimentseparation, Dissertation Olivia Stiehl^[1].

$$p_{g,u}(\lambda_{p_{g,u}}) = 0.15 \cdot p_{g,\text{max}}, \quad p_{g,o}(\lambda_{p_{g,o}}) = 0.85 \cdot p_{g,\text{max}} \quad (4.6)$$

$$\langle\lambda\rangle_g = \frac{\lambda_{p_{g,u}} + \lambda_{p_{g,o}}}{2} \quad (4.7)$$

Der Mittelwert $\langle\lambda\rangle_g$ wird nach Gl. (4.7) berechnet. Anschließend wird die Phasorwolke an der Stelle $\langle\lambda\rangle_g$ orthogonal zur Regressionsgerade in zwei Bereiche eingeteilt: tendenziell größere: $\lambda > \langle\lambda\rangle_g$ und tendenziell kleinere Lebenszeitfraktionen: $\lambda < \langle\lambda\rangle_g$. Die

größeren Lebenszeitfraktionen entsprechen tendenziell kleineren mittleren Lebenszeiten $\langle \tau \rangle$, die kleineren Fraktionen tendenziell größeren $\langle \tau \rangle$.

Die größeren Fraktionen werden dem Zytoplasma und den Mitochondrien (Zytoplasma-region: **B**), die kleineren dem Nukleoplasma und den Nukleoli (Nukleoplasma-region: **A**) zugeordnet. Die Phasorpunkte, die den beiden Regionen zugeordnet werden, können im Anschluss in den Bildbereich übertragen werden, da der Ursprung jedes Phasorpunktes mit einem Koordinatenvektor (x, y) im Bildraum verknüpft ist. An dieser Stelle wird noch keine genauere Unterscheidung zwischen dem Nukleoplasma und den Nukleoli getroffen. Eine Unterscheidung zwischen dem Zytoplasma und den Mitochondrien ist über *Phasor-Slicing* mit dem molekularen Rotor DASPMI nicht möglich, da deren Phasorschnitte zu stark überlappen.

Die Nukleoplasma-region wird im Bildraum morphologisch geschlossen und für die Separation der Phasorwolke im roten Kanal als Maske verwendet. Nur diejenigen Phasorpunkte im roten Kanal, die aus der Nukleoplasma-region stammen, werden weiter verwendet. An dieser Stelle wird ausgenutzt, dass das Zytoplasma und das Nukleoplasma im roten Kanal ihre Positionen tauschen, siehe Abb. 4.5. Durch diesen Positionswechsel spaltet sich die Nukleoliregion durch die zytoplasmische von der Nukleoplasma-region ab und kann durch eine weitere Trennregel vom Nukleoplasma getrennt werden. Die Nukleoplasma-Phasorwolke des roten Kanals wird entlang derjenigen Regressionsgerade $p_r(\lambda)$, die über das gesamte Phasorpunkteensemble berechnet wird, abgetastet und $\lambda_{p_r,m}$ gesucht:

$$p_{r,m}(\lambda_{p_r,m}) = 0.55 \cdot p_{r,max}.$$

Bei $\lambda_{p_r,m}$ wird die Nukleoplasma-Phasorwolke orthogonal zur Regressionsgerade in zwei Bereiche geteilt und nur die Phasorpunkte werden für die Abbildung in den Bildraum verwendet, für die gilt:

$$\lambda < \lambda_{p_r,m} \tag{4.8}$$

Die Bildbereiche der Phasorpunkte, für die Gl. (4.8) gilt, werden den Nukleoli (**C**) zugeordnet. Im letzten Schritt werden unzusammenhängende Pixel und kleine Objekte im Bildbereich aus der Rekonstruktion entfernt. Dieser Schritt ist nicht zwingend notwendig, wird aber zur Entfernung von Artefakten genutzt. Wenn die Statistik der pixelweisen Ankunftszeithistogramme niedrig ist, $N_{phot} < 100$, kann diese Maßnahme dazu führen, dass in der Rekonstruktion leere Bereiche zwischen Nukleoplasma und Zytoplasma [Abb. 4.8] oder Löcher in der Rekonstruktion entstehen.

Phasor-Slicing verwendet ausschließlich die Lebenszeitfraktion λ als Zuweisungsparemeter und liefert vergleichbare Resultate zur K-Means-Methode [Abb. 4.6]^[15]. Im nächsten Kapitel werden einige Kompartimentzuweisungen gezeigt.

4.3.2. Resultate

Nach Anwendung des in Kapitel 4.3.1 beschriebenen Algorithmus auf FLIM-Daten können in vielen Fällen bekannte Zellkompartimente wie das Nukleoplasma, die zytoplasmische Region und die Nukleoli in den *Phasor-Slicing*-Bildern identifiziert werden. Der Algorithmus ergibt bei physiologischen Zellen in allen Fällen glaubwürdige Separationsergebnisse, während je nach Behandlung im Falle von Cisplatin die Erfolgsquote auf 80 % und nach H_2O_2 -Behandlung weiter auf 30 % sank. Eine Rekonstruktion wird erfolgreich genannt, falls alle drei Bereiche, die zytoplasmische Region, das Nukleoplasma und die Nukleoli, zugewiesen werden können. Abb. 4.7 zeigt eine Zusammenfassung erfolgreicher Separationen am Beispiel von physiologischen, Cisplatin- und H_2O_2 -behandelten HeLa-Zellen.

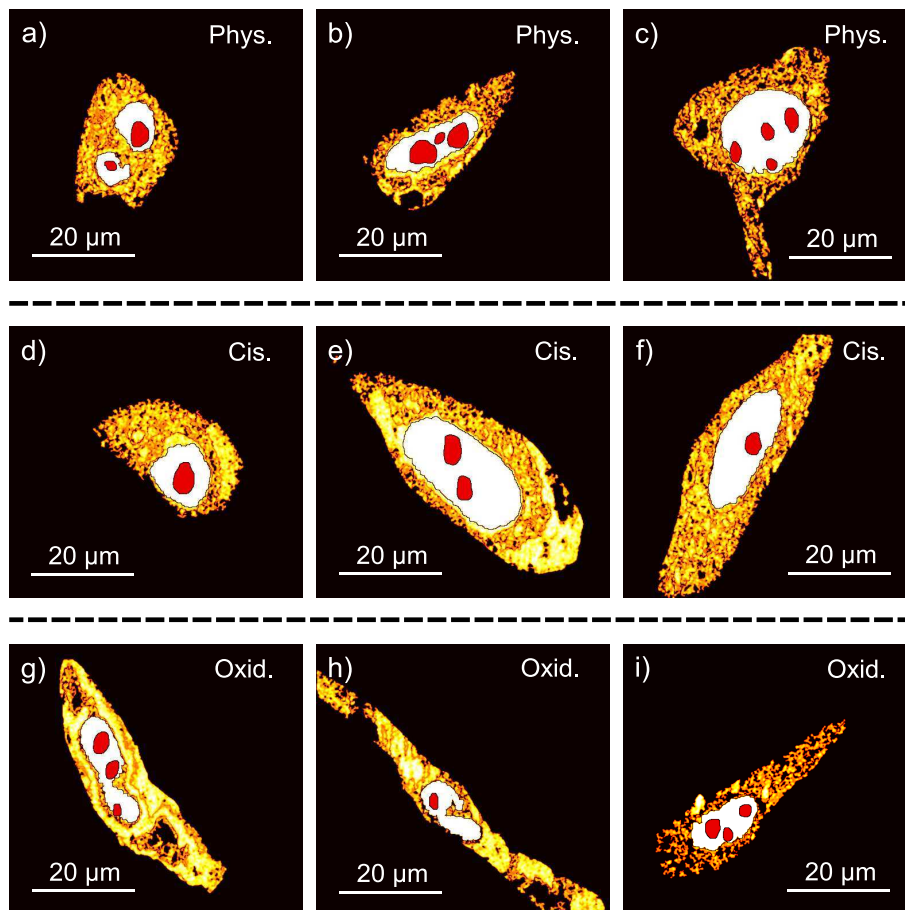


Abbildung 4.7.: *Phasor-Slicing* Resultate. Gezeigt sind die Resultate der Kompartimentseparation über *Phasor-Slicing*. Die Nukleoli sind rot, das Nukleoplasma weiß und das Zytoplasma sowie Mitochondrien gelb markiert. Über *Phasor-Slicing* ist keine Unterscheidung zwischen dem Zytoplasma und den Mitochondrien möglich. Während bei physiologischen Zellen [Phys. a), b), c)] die Rekonstruktion in allen Fällen erfolgreich war, sank die Erfolgsquote bei Cisplatin-behandelten Zellen [Cis. d), e), f)] auf ~ 80 % und bei Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt waren [Oxid. g), h), i)], weiter auf ~ 30 %.

4.3.3. Spezifitätscharakterisierung

Bei Betrachtung der Intensitätsbilder beider Kanäle in Abb. 4.8 fällt auf, dass die über *Phasor-Slicing* rekonstruierte Information bereits in der Helligkeit der Bilder enthalten ist.

Um zu prüfen, ob *Phasor-Slicing* unter ausschließlicher Verwendung der Fraktionsbeiträge λ von DASPMI typische Zellregionen wie die zytoplasmische Region, das Nukleoplasma und die Nukleoli voneinander separieren kann, werden aus den pixelweisen Histogrammen besonders heller Pixel durch einen Histogrammrekonstruktionsalgorithmus neue Histogramme mit limitierter Photonenzahl N_{phot} erstellt. Diese Begrenzung der Statistik betrifft helle Pixel stärker als dunklere, und gleicht, je nach dem Schwellenwert der maximalen Photonenzahl N_{phot} je Ankunftszeithistogramm, die Intensität der Bilder an.

Die Histogrammrekonstruktion wählt im ersten Schritt ein gleichverteilt zufälliges Zeitinkrement aus den $N_{\text{bins}} = 1562$ möglichen und zählt ein Photon in dem gewählten Inkrement $\Delta\tau_A$ zum neuen Histogramm, wenn die im Anschluss gezogene, gleichverteilte Zufallszahl kleiner oder gleich dem Wert $N(\tau_A)$ im ursprünglichen normierten Histogramm ist. Wenn das Integral des erstellten Histogramms N_{phot} erreicht, wird die Rekonstruktion abgebrochen. Auf diese Weise wird im Laufe vieler Züge das Histogramm mit der ursprünglichen Lebenszeitcharakteristik rekonstruiert, mit der Freiheit die Photonenzahl, und damit die Helligkeit und zugleich das SNR des Histogramms nach oben zu limitieren.

Diese Herangehensweise erlaubt es, die Helligkeitsinformation der pixelweisen Histogramme untereinander anzugleichen und die Separationsmethode *Phasor-Slicing* allein von der Lebenszeitinformation abhängig zu machen. Die Resultate der Kompartimentseparation einer ausgewählten Zelle mit verschiedenen maximalen Helligkeitswerten sind in Abb. 4.8 gezeigt.

Um die Unabhängigkeit der *Phasor-Slicing*-Methode von der Intensität deutlich zu machen, wird das SNR mancher Histogramme deutlich reduziert. Diese Signalreduktion führt dazu, dass die Kompartimentspezifität der Rekonstruktion in Abb. 4.8 mit sinkender Photonenzahl je Histogramm ebenfalls zurückgeht. Um eine völlige Unabhängigkeit der Separation von der Helligkeit nachzuweisen, müssten alle zur Separation verwendeten Pixel eine Mindesthelligkeit von etwa $N_{\text{phot}} = 1000$ Photonen haben. Diese Mindestphotonenzahl wird von Gratton et al.^[112], vom Einsatzzweck unabhängig, generell bei Anwendung der Phasor-Methode empfohlen.

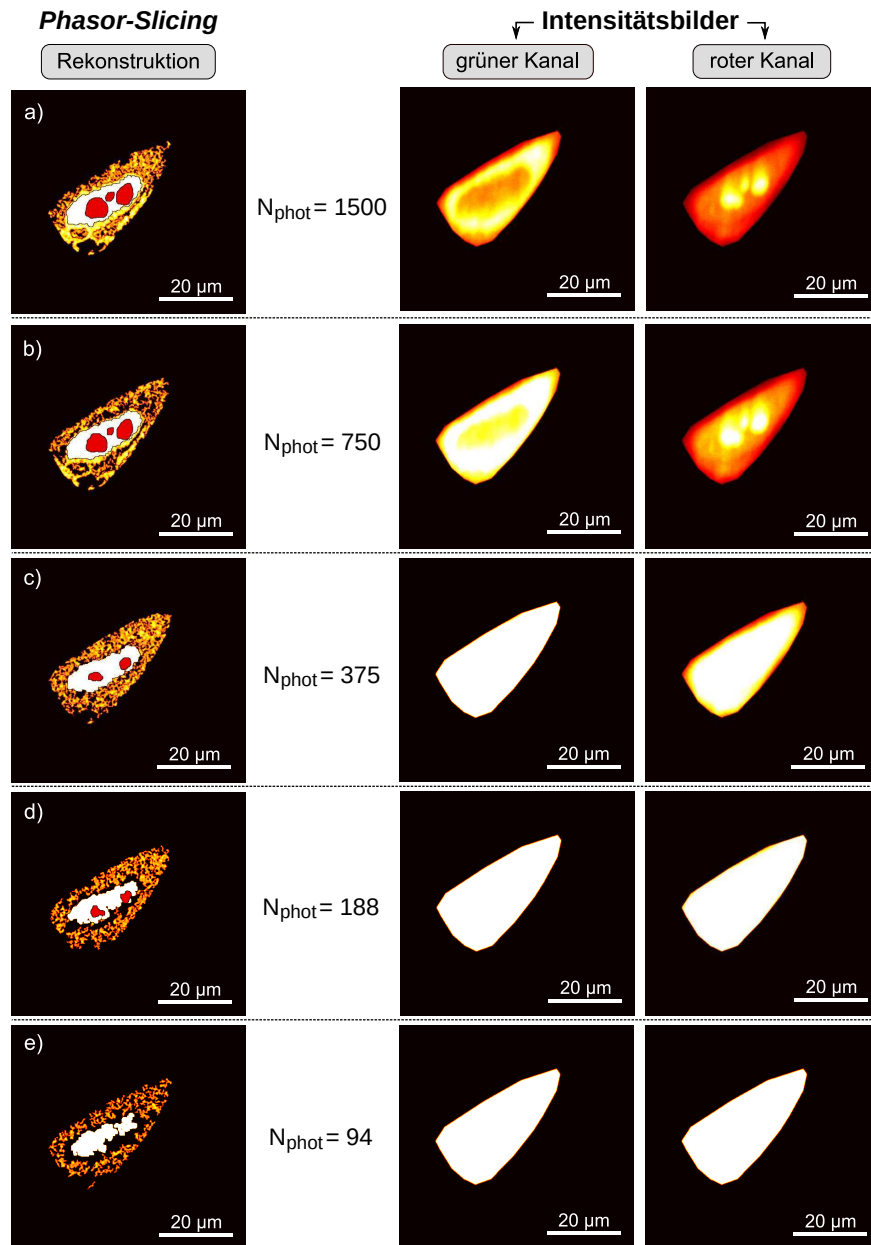


Abbildung 4.8.: Phasor-Slicing unter Helligkeitsequilibrierung. Gezeigt sind die Resultate der Kompartimentrekonstruktion unter sukzessiver Equilibrierung des Helligkeitsprofils am Beispiel einer physiologischen HeLa-Zelle. **Links:** Phasor-Slicing-Resultate. Rechts daneben die maximale Photonenzahl pro Pixel N_{phot} . **Rechts:** Intensitätsbilder bei angegebener Photonenzahl N_{phot} im grünen und roten Kanal. In den Rekonstruktionen sind Nukleoli rot, das Nukleoplasma weiß und das Zytoplasma inklusive Mitochondrien gelb dargestellt. Während bei **a)** die volle Statistik, $N_{\text{phot}} = 1500$, zur Auswertung bereitsteht, wurde diese bei den folgenden **b)**, **c)**, **d)**, **e)** jeweils halbiert **b)** $N_{\text{phot}} = 750$, **c)** $N_{\text{phot}} = 375$, **d)** $N_{\text{phot}} = 188$, **e)** $N_{\text{phot}} = 94$. Es wurden aus den ursprünglichen pixelweisen Histogrammen, wie im Fließtext beschrieben, neue Histogramme mit limitierter Photonenzahl erstellt. Mithilfe dieser pixelweisen Ankunftszeithistogramme wurde anschließend Phasor-Slicing durchgeführt. Bei den Beispielen **c)**, **d)**, und **e)** sind keine Helligkeitsunterschiede im FLIM-Intensitätsbild zu erkennen, trotzdem erfolgt noch die Separation in physiologisch relevante Bereiche. Bei **c)** und **d)** wird jeweils nur ein Nukleolus nicht erkannt. Selbst bei **e)**, $N_{\text{phot}} = 94$, ist die Zelle noch in zwei Bereiche, die Nukleoplasmaregion und die Zytoplasmaregion, unterteilbar.

4.4. Diskussion

Kernaussagen

DASPMI eignet sich als viskositätssensitiver Stresssensor sowohl für *screening*-Anwendungen als auch zur Zellkompartimentseparation über die *Phasor-Slicing*-Methode. Die Spezifität für *screening*-Anwendungen ist unter oxidativem Stress in den Mitochondrien am höchsten. Die viskositätsabhängige Kompartimentseparation ist bei der Anwendung auf physiologische und Cisplatin-behandelte HeLa-Zellen erfolgreich, die Spezifität nimmt bei zunehmendem Stress, insbesondere dem oxidativen ab.

4.4.1. DASPMI in der Anwendung als Stresssensor

Es konnte gezeigt werden, dass die Mitochondrien unter Stressbehandlung verschiedene fraktionelle Verschiebungen in der Phasordarstellung zeigen, was den Einsatz der Phasordarstellung für *screening*-Anwendungen ermöglicht. Cisplatin verursacht in eukaryotischen Zellen wie die meisten Chemotherapeutika oxidativen Stress^{[103] [97]} und im mitochondrialen Bereich die Quervernetzung der mtDNA. Darüber hinaus verursacht generell, auch durch andere Substanzen induzierter oxidativer Stress, DNA- und mtDNA-Quervernetzungen^[113].

Die Fraktionsverringering von $\lambda_{r,max}$ im roten Kanal kann in Mitochondrien durch die Cisplatin-Behandlung bereits ab $\alpha = 0.01$ nachgewiesen werden, durch die H_2O_2 -Behandlung erst ab $\alpha = 0.05$. Daraus wird geschlossen, dass die Quervernetzungen in den Mitochondrien durch die Cisplatin-Behandlung zu einem tendenziell höheren Viskositätsanstieg führen als durch die H_2O_2 -Behandlung. Der Unterschied kann jedoch nicht groß sein, da zwischen der Cisplatin-Behandlung und der H_2O_2 -Behandlung im direkten Vergleich kein signifikanter Unterschied in der Position der Fraktionsmaxima $\lambda_{(g,r),max}$ nachgewiesen werden kann.

Als Stresssensor eignet sich DASPMI für die Untersuchung des Zytoplasmas, des Nukleoplasmas und der Nukleoli in Verbindung mit der Phasor-Analyse nicht. In diesen Regionen können mit Hilfe der Phasorschnitte bis zu einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ keine wesentlichen Fraktionsverschiebungen durch die getesteten Stressbehandlungen nachgewiesen werden.

In den Experimenten konnte nach allen Behandlungsarten eine mittlere Lebenszeiterhöhung von DASPMI beobachtet werden, nur in Einzelfällen, wie den Nukleoli im roten Kanal, eine Lebenszeitverringering. DASPMI reagiert auf die Viskositätserhöhung der Mikroumgebung mit einer mittleren Lebenszeiterhöhung und auf einen Polaritätsanstieg mit einer mittleren Lebenszeitverringering. Deshalb wird darauf geschlossen, dass

der Einfluss der Polarität auf den Sensor deutlich geringer als der der Viskosität ist.

4.4.2. Viskositätsspezifität und *Phasor-Slicing*

Darüber hinaus wurde ein Algorithmus für die Separation zellulärer Fluide entwickelt, der im Zusammenspiel mit DASPMI in vielen Fällen erfolgreich funktioniert und publiziert wurde^[15]. Durch den zusätzlichen K-Means-Algorithmus konnte die Ursache für das Gelingen der *Phasor-Slicing*-Methode nachgewiesen werden. Der Grund liegt darin, dass die einzelnen Kompartimente bezüglich ihrer Viskositäten verschieden sind und damit die Lebenszeiten, die den Relaxationen ICTS und TICTS zugewiesen werden, je nach zellulärer Umgebung mit der Fraktion λ gewichtet werden.

Die sukzessive Verringerung der Histogrammstatistik ergab, dass bereits ab einem Integralwert von $N_{\text{phot}} \approx 100$ Photonen pro Histogramm eine grobe intrazelluläre Unterscheidbarkeit anhand der Lebenszeitfraktionen möglich ist. Es wurde gezeigt, dass *Phasor-Slicing* auch ohne die Intensitätsinformation der Histogramme eine kompartimentspezifische Separation in mindestens zwei Bereiche, die Nukleoplasma- und die Zytoplasma-Region, ermöglicht. Die Spezifität geht jedoch bei niedrigen Helligkeitswerten und bei Zellen unter Stressbehandlung deutlich zurück. Überlappen sich die Verteilungen der Einzelkompartimente zu stark, ordnet die Phasorseparation zu viele Pixel des einen Zellkompartiments einem anderen zu. Im grünen Kanal wirkt sich dies durch das Verschwimmen der Grenze zwischen Nukleoplasma und Zytoplasma aus. Im roten Kanal macht sich dieser Fehler durch Ausfransungen der Nukleoli und dem Verschwimmen der Nukleoligrenzen bemerkbar.

Obwohl DASPMI im Zusammenhang mit *Phasor-Slicing* in vielen Fällen hinreichend spezifisch auf die zelluläre Umgebung reagiert hat, ist der molekulare Rotorfarbstoff nur mit Einschränkungen für die Zellkompartimentseparation geeignet. Ein wesentlicher Nachteil dieses molekularen Rotors ist das konträre Lebenszeitverhalten in zugleich polaren und viskosen Medien, da polare Umgebungen die Relaxation begünstigen und viskose Umgebungen die Relaxation behindern. Darüber hinaus ist die Relaxation von DASPMI sehr komplex und bewirkt ein breites Fraktionsspektrum im Phasorraum, welches bei komplexeren Separationen zu Falschzuweisungen führt. Zusätzlich ist es, ebenso wie andere Fluorophore, von Fluoreszenzlöschungsprozessen beeinflusst, auch wenn dieser Einfluss nicht signifikant ist.

4.4.3. Zusammenfassung

Zusammenfassend kann man sagen, dass *Phasor-Slicing* eine interessante Methode zur Zellkompartimentseparation darstellt und sich weitere Untersuchungen mit alternativen molekularen Rotoren lohnen. Darüber hinaus könnten die vorliegenden Ergebnisse die Entwicklung hydrophiler molekularer Rotoren mit höherer Viskositätsspezifität motivieren. Die Methode lässt sich automatisieren, auf modernen Rechnern parallelisieren und ermöglicht durch die Anwendung der FFT (*fast Fourier transformation*)

hohe Durchsätze. Im Hinblick auf pharmazeutische Anwendungen im Zusammenhang mit der kompartimentspezifischen Lokalisation von Wirkstoffen (*drug screening*) könnte diese Methode Anwendung finden. Auch zur Analyse von chemotherapeutischem Stress, insbesondere durch Cisplatin, könnte die Sensitivität von DASPMI ausreichend sein und im medizinischen Bereich Anwendung finden.

Oxidativer Stress in lebenden Zellen

Ein Paradoxon des Metabolismus und des Lebens ist, dass obwohl der Großteil der Lebewesen Sauerstoff zum Leben benötigt, das Sauerstoffmolekül ein hochreaktiver Stoff ist und freie Sauerstoffradikale [ROS] bilden kann^[114]. ROS sind hochreaktive Moleküle, die zusätzliche Elektronen enthalten und sowohl DNA und Membranen, als auch wichtige zelluläre Proteine oxidieren können. Bekannte Folgen oxidativen Stresses sind DNA-Strangbrüche und DNA-Quervernetzungen^[113].

Oxidativer Stress ist nicht gleich der Freisetzung von ROS. Eine geringe Menge ROS ist sogar notwendig für die Signaltransduktion und Regulation des Zellmetabolismus^[115] und damit generell gesundheitsfördernd^{[116] [117] [118]}. Dieser Effekt bei im Allgemeinen schädlichen oder giftigen Substanzen wurde bereits von Paracelsus formuliert und wird Hormesis genannt. Zu hohe ROS-Werte stören dagegen die Zellreplikation und führen unter anderem zu Herzkreislauferkrankungen^[119] oder beschleunigen den Verlauf der Alzheimer-Erkrankung, wobei letzterer Zusammenhang umstritten ist^[120]. Auch im Zusammenhang mit der Parkinson-Krankheit^[121] oder dem Alterungsprozess^[122] steht oxidativer Stress im Fokus der Forschung. Der Bezug zur Medizin ist ebenfalls vorhanden, da eine Vielzahl von Chemotherapeutika oxidativen Stress verursachen, der wiederum die Therapieeffizienz verringert^[123] und krebsfreie Zellen ebenfalls schädigt^[124]. Darüber hinaus werden Sauerstoffradikale wie das Hyperoxid-Anion $O_2^{\cdot-}$ und Singulett-Sauerstoff 1O_2 ^[125] auch bei der Fluoreszenzmikroskopie freigesetzt^[126] und sind für das frühzeitige Bleichen von Fluorophoren (*photobleaching*) verantwortlich. Weitere wichtige Sauerstoffradikale sind das hochreaktive Hydroxyl-Radikal ($HO\cdot$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und viele mehr^[127].

Eukaryotische Zellen haben zur Kompensation von oxidativem Stress verschiedene Mittel, unter anderem das Enzym Glutathion-Reduktase, das für die Wiederherstellung von oxidiertem Glutathion^[128], dem wichtigsten intrazellulären Antioxidant, verantwortlich ist und eine Reihe komplexer biochemischer Pfade^{[129] [130] [131] [132]}, die nicht Thema dieser Arbeit sind. Ein weiterer möglicher Einfluss in der Regulation reaktiver Sauerstoffspezies ist die Ca^{2+} -Konzentration der Zelle. Diese Wechselwirkung ist Gegenstand der Forschung^[133] und im Detail noch nicht vollständig verstanden. Bekannte

Antioxidantien aus dem Alltag sind Capsaicin^[134], der Wirkstoff, der Chili-Schoten die Schärfe verleiht, Vitamin C^[135] und das Lycopersium der Tomate^[136].

Aus medizinischer und biophysikalischer Sicht ist also die Entwicklung und Prüfung von Redox-Sensoren ein wichtiger Bestandteil der Forschung. Der in diesem Projekt verwendete Redox-Sensor CellRox-DeepRed [Kapitel 2.3] wird durch die Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies in den fluoreszenten Zustand überführt. Im Rahmen dieses Projektes wird geprüft, ob und in welcher Weise dieser Farbstoff den Einfluss von oxidativem Stress auf HeLa- und U2OS-Zellen *in vivo* über eine Veränderung seiner Fluoreszenzlebenszeit und Fluoreszenzintensität frühzeitig wiedergeben kann.

5.1. Materialien und Methoden

In diesem Abschnitt wird die Vorbereitung und oxidative Stressbehandlung der HeLa- und U2OS-Zellen vorgestellt. Außerdem werden die Intensitätsmessungen und die FLIM- und FLPM-Experimente beschrieben. Die Zellensamplegröße je Experiment ist in Tab. 5.1 gezeigt.

Alle Experimente wurden an einem Leica-TCS-SP5-PicoQuant-TCS-PC-System mit einem Leica Ölimmersionsobjektiv mit der Vergrößerung $M_{\text{Obj}} = 63$ und der numerischen Apertur $NA = 1.4$ durchgeführt. Die Pixelzahl wurde auf $N_x \times N_y = 512 \times 512$ festgesetzt. Die Pinhole-Größe $PH = 2 \text{ AU}$ wurde in allen Experimenten verwendet. Weitere experimentelle Parameter sind in den folgenden Abschnitten aufgeführt.

ZELLEN	INT.		FLIM		FLPM	
	U	T	U	T	U	T
HeLa	27	17	31	65	-	5
U2OS	31	23	75	125	-	-

Tabelle 5.1.: Zellensamplegröße: Intensitätsmessung (INT.), FLIM-Experimente, FLPM-Experimente. Zelltypen: HeLa und U2OS. Die Tabelle zeigt die je nach Behandlung ausgewertete Anzahl der HeLa- und U2OS-Zellen für die verschiedenen Experimente. **U:** unbehandelte Zellen, **T:** Menadion-behandelte Zellen.

5.1.1. Vorbereitung der HeLa- und U2OS-Zellen

Als Stressreagenz wurde Menadion (Merck - Sigma Aldrich) und als oxidativer Stresssensor der Farbstoff CellRox-DeepRed (Thermo Fischer) verwendet. HeLa- bzw. U2OS-Zellen wurden am Vortag der Messung in 2-well Probenkammern (ibidi) ausgesät. 10 mg kristallines Menadion wurde zur Herstellung der Menadion-Lösung in 6.25 ml DMSO gelöst, gerührt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zellen wurden anschließend für 1 h bei 37 °C in 1 ml DMEM unter Zugabe von 10 µl Menadion-Lösung inkubiert, was einer Konzentration von 100 µM entspricht. Die Zellen wurden anschließend einmal mit PBS gewaschen. Die Färbung mit CellRox-DeepRed erfolgte unter Zugabe von

1 ml einer Lösung die aus 10 μl CellRox-DeepRed und 2495 μl DMEM hergestellt wurde. Inkubation für weitere 30 min bei 37 °C, einmaliges Waschen mit PBS und Mediumwechsel auf 1 ml Mikroskopiemedium [Kapitel 2.1] schließen den Vorbereitungsvorgang ab.

5.1.2. Fluoreszenzmikroskopie und Intensitätsmessung

Für die Intensitätsmessungen wurden folgende Einstellungsparameter am Mikroskop verwendet: Pixelgröße: $p_s = 240 \text{ nm}$, Photomultipliertspannung $U_{\text{acc}} = 900 \text{ V}$, Photomultiplier Detektionsbereich $\Delta\lambda_{\text{det}} = 640 - 700 \text{ nm}$, Laser: Festkörperlaser $\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$ einheitlich bei der Leistung $P_L \approx 600 \mu\text{W}$, Abtastfrequenz $f_{\text{scan}} = 400 \text{ Hz}$. Die Option *frame-average* wurde auf den Wert $N_{\text{av}} = 3$ eingestellt. Bei dieser Option werden N_{av} Bilder hintereinander aufgenommen und anschließend gemittelt. HeLa- und U2OS-Zellen sind in Abb. 5.1 im unbehandelten und Menadion-behandeltem Zustand gezeigt.

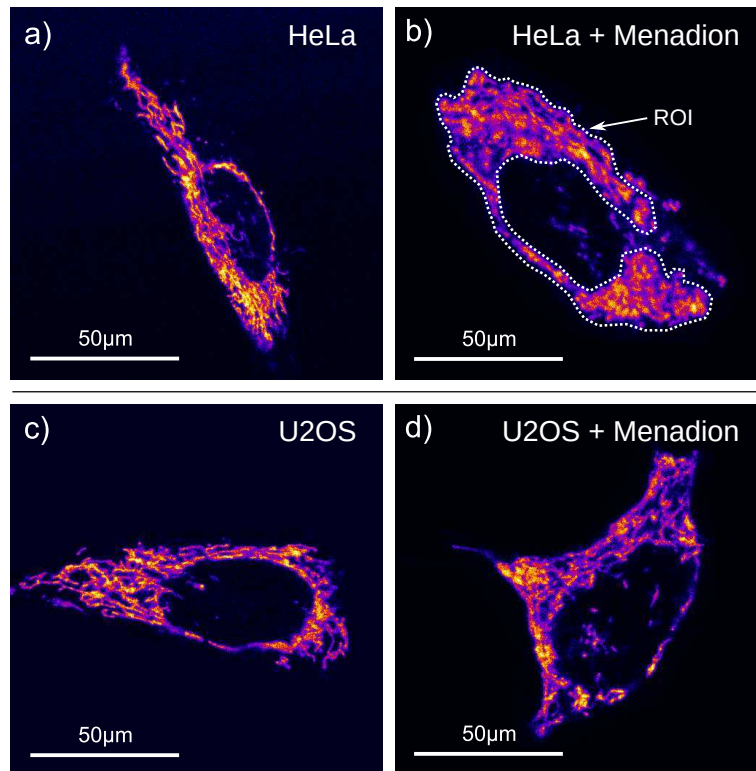


Abbildung 5.1.: Intensitätsbilder der HeLa- und U2OS-Zellen vor und nach der Menadion-Behandlung. Aufgrund der langen Behandlungsdauer können nicht die selben Zellen sowohl im unbehandelten als auch behandelten Zustand untersucht werden. **a)** HeLa-Zelle Unbehandelt, **b)** HeLa-Zelle nach der Menadion-Behandlung. Die in **b)** eingezeichnete **ROI** zeigt die Selektion der auszuwertenden Pixel, bzw. der zugehörigen pixelweisen Histogramme. **c)** U2OS-Zelle unbehandelt, **d)** U2OS-Zelle nach der Menadion-Behandlung. Reaktive Sauerstoffspezies werden beim Zellmetabolismus, auch im unbehandelten Zustand, vorwiegend in den Mitochondrien gebildet. Die CellRox-DeepRed-Signalerhöhung im mitochondrialen Bereich ist in der Abbildung zu sehen. Während in **a)** und **c)** die mitochondriale Struktur im zytoplasmischen Bereich deutlich erkennbar ist, sieht diese in **b)** und **d)** diffus und nicht intakt aus. Diese Defekte sind bei HeLa-Zellen bereits in den Intensitätsbildern deutlich erkennbar.

5.1.3. FLIM-Experimente

Die Anregung von CellRox-DeepRed erfolgte mit einem gepulster Laser mit der Wellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 640 \text{ nm}$ und der Pulsfrequenz $f_{\text{ex}} = 40 \text{ MHz}$ bei niedrigen Laserintensitäten. Die Abtastfrequenz war $f_{\text{scan}} = 400 \text{ Hz}$, der Detektionsbereich: $\Delta\lambda_{\text{det}} = 647 - 703 \text{ nm}$. Die Pixelgröße wurde an die Zellgröße angepasst. Für den verwendeten Laser in Kombination mit dem Objektiv ergibt sich nach Gl. (1.4) eine maximale Pixelgröße von $p_{\text{s,max}} = 325 \text{ nm}$, die bei keiner Messung überschritten wurde. Die Messdauer wurde begrenzt auf maximal $T_{\text{mess}} = 10 \text{ min}$ und die Photonenzahl pro Pixel auf $N_{\text{phot}} = 1000$, je nachdem welche Grenze zuerst erreicht wurde. Die Zellenensemblegröße für diese Experimente ist in Tab. 5.1 gezeigt.

5.1.4. FLPM-Experimente

Einzelne FLPM-Messungen wurden für $T_{\text{mess}} = 30 \text{ s}$ an Menadion-behandelten HeLa-Zellen sowohl im Nukleoplasma als auch im Zytoplasma gemäß der Beschreibung in Kapitel 3.1.2 durchgeführt. Die Zellenensemblegröße für diese Experimente ist in Tab. 5.1 gezeigt. Die Anregung von CellRox-DeepRed erfolgte mit einem gepulster Laser mit der Wellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 640 \text{ nm}$ und der Pulsfrequenz $f_{\text{ex}} = 40 \text{ MHz}$. Detektionsbereich war $\Delta\lambda_{\text{det}} = 647 - 703 \text{ nm}$. Abb. 5.2 zeigt eine Menadion-behandelte HeLa-Zelle mit den markierten Messorten.

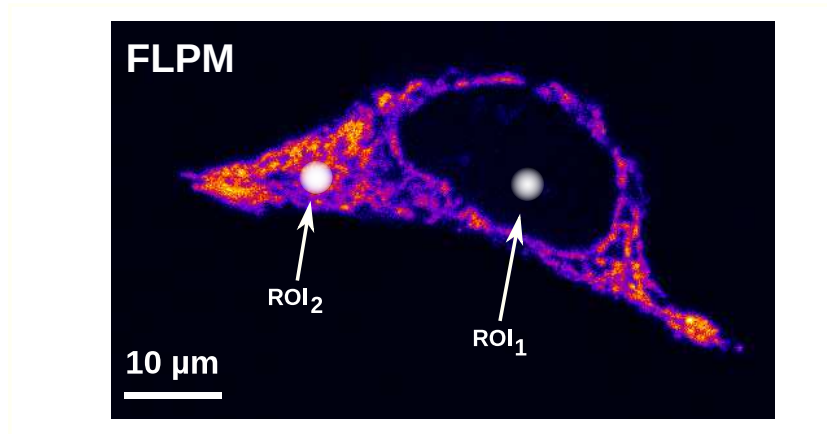


Abbildung 5.2.: FLPM-Messung in einer HeLa-Zelle. Die Abbildung zeigt eine mit CellRox-DeepRed gefärbte HeLa-Zelle nach der Behandlung mit Menadion. Die Behandlung mit Menadion ist an der diffusen Struktur der Mitochondrien erkennbar. ROI₁ (Nukleoplasma) und ROI₂ (Zytoplasma) markieren die beiden Messorte der FLPM-Messungen. CellRox-DeepRed färbt lediglich die zytoplasmische Region, die Kernhülle ist für den Farbstoff impermeabel.

5.1.5. Prüfung der Autofluoreszenz von Menadion

An einigen HeLa- und U2OS-Zellen wurde die Autofluoreszenz von Menadion geprüft. Hierfür wurden Zellen nach Kapitel 5.1.1 mit Menadion behandelt und ohne CellRox-DeepRed-Färbung Fluoreszenzmikroskopieexperimente, wie in Kapitel 5.1.2

beschrieben, durchgeführt. Im Detektionsbereich $\Delta\lambda_{\text{det}} = 647 - 703 \text{ nm}$ konnte keine Autofluoreszenz von Menadion nachgewiesen werden. Eine Auswertung wurde daher nicht durchgeführt.

5.2. Photophysikalische Charakterisierung des Redox-Sensors

In diesem Kapitel werden allgemeine photophysikalische Parameter des Redox-Sensors CellRox-DeepRed ermittelt, die für die weitere Untersuchung notwendig sind. Zum Einen wird das Lebenszeitverhalten von CellRox-DeepRed mit Hilfe von zwei Modellen, der einfachexponentiellen und der doppelxponentiellen Kurvenanpassung, geprüft und bewertet. Zum Anderen wird die Korrelation aufeinanderfolgender Ankunftszeiten auf Abhängigkeiten wie den Memory-Effekt^[137] untersucht. Diese Untersuchung soll die Möglichkeit ausschließen, dass der Aufbau der Ankunftszeithistogramme in Abhängigkeit der Laborzeit einer bestimmten Systematik gehorcht.

5.2.1. Verteilungsverhalten der Ankunftszeithistogramme

Da über den verwendeten Farbstoff CellRox-DeepRed zum Zeitpunkt der Untersuchungen keine Informationen bezüglich des Verteilungsverhaltens vorlagen, wurde sowohl die einfach- wie auch die doppelxponentielle Charakteristik der Ankunftszeithistogramme nach Kapitel 3.2.2 geprüft und mit dem Maß der mittleren quadratischen Abweichung $R(m)$ pro Zeitinkrement $\Delta\tau_A = 16 \text{ ps}$ in Abhängigkeit des optimalen Startwertes m_0 bewertet.

Bezogen auf das einheitlich bei $\tau_{A,\text{max}} = 1.71 \text{ ns}$ bestimmte Histogrammmaximum sind die mittleren Startwerte für die doppelxponentielle Kurvenanpassung $\langle m_0 \rangle$ wie auch die mittlere absolute Ankunftszeit, bei der die Anpassung beginnt, $\langle \tau_{A,\text{id}} \rangle$ je Behandlungsart und Zelltyp in Tab. 5.2 gelistet. Bei der einfachexponentiellen Kurvenanpassung wurde in allen Fällen $\langle m_0 \rangle = 100$ ermittelt.

STARTWERTE DE-Fit	HeLa		U2OS	
	U	T	U	T
$\langle m_0 \rangle \pm s_{m_0}$	27 ± 7	21 ± 11	22 ± 9	21 ± 8
$\langle \tau_{A,\text{id}} \rangle \pm s_E \text{ [ns]}$	2.14 ± 0.11	2.05 ± 0.18	2.06 ± 0.14	2.05 ± 0.13

Tabelle 5.2.: Startwerte der doppelxponentiellen Kurvenanpassung. Gezeigt sind die Mittelwerte der Startpunkte $\langle m_0 \rangle$ mit der Standardabweichung s_{m_0} in Einheiten der Zeitinkremente der Breite $\Delta\tau_A = 16 \text{ ps}$. $\tau_{A,\text{id}}$ ist der Startwert der Kurvenanpassung bezogen auf den Nullpunkt $\tau_A = 0 \text{ ns}$ des Ankunftszeithistogrammes.

Bei der Bewertung der Histogrammcharakteristik ist sowohl der Ensemblemittelwert der Abweichung $\langle R(m_0) \rangle_E$ je Behandlungszustand und Zelltyp, wie auch dessen Streuung s_E ein Qualitätsmaß für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse. Die Resultate der Prü-

fung sind in Tab. 5.3 gezeigt. Man erkennt dort, dass die Anpassung über ein doppel-exponentielles Modell mindestens dreimal geringere Abweichungen, $R_{\text{res}} = 3.2 - 4.2$, von den experimentellen Daten zur Folge hat. Dies ist ein signifikanter Unterschied und lässt den Schluß zu, dass die tatsächliche Photophysik von CellRox-DeepRed in lebenden HeLa- und U2OS-Zellen tendenziell einen doppel-exponentiellen Charakter hat. Dies gilt jedoch unter Vorbehalt, da die sukzessive Erweiterung der Multiexponentialität des Anpassungsmodells die Unterschiede zwischen Experiment und Theorie prinzipiell verringert^[138].

RESIDUEN $\langle R(m_0) \rangle_E \cdot 10^7$	HeLa U $\langle R(m_0) \rangle_E \pm s_E$	HeLa T $\langle R(m_0) \rangle_E \pm s_E$	U2OS U $\langle R(m_0) \rangle_E \pm s_E$	U2OS T $\langle R(m_0) \rangle_E \pm s_E$
SE-Fit	68.2 ± 2.0	102 ± 6.4	61.5 ± 1.5	74.3 ± 1.5
DE-Fit	16.3 ± 2.0	28.7 ± 2.5	19.1 ± 1.4	19.3 ± 1.3
R_{res}	4.2	3.6	3.2	3.8

Tabelle 5.3.: Residuen: Vergleich einfach- und doppel-exponentieller Kurvenanpassung. Die Tabelle zeigt die ensemblegemittelte Abweichung der Kurvenanpassungen pro Zeitinkrement $\langle R(m_0) \rangle_E$ von den auf $N(\tau_{A,\text{id}}) = 1$ normierten Histogrammen und den Fehler des Mittelwertes s_E [Kapitel 3.2.5]. **U:** unbehandelte Zellen. **T:** Menadion-behandelte Zellen. Für jede Behandlungsart und Zelltyp wurde über das in Tab. 5.1 gezeigte Ensemble gemittelt, um $\langle R(m_0) \rangle_E$ zu erhalten. **SE-Fit:** Kurvenanpassung mit einfachexponentiellem Modell [Gl. (3.3)]. **DE-Fit:** Kurvenanpassung mit doppel-exponentiellem Modell [Gl. (3.4)]. In der Tabelle sind die Residuen in den Zeilen SE-Fit und DE-Fit mit dem Faktor 10^7 skaliert gezeigt. R_{res} ist das Verhältnis **SE-Fit/DE-Fit** der Residuen von einfachexponentieller und doppel-exponentieller Kurvenanpassung.

5.2.2. Korrelation der Photonenankunftszeiten

In diesem Kapitel wird geprüft, ob abhängig davon, welche Photonenankunftszeit τ_A zuerst gemessen wird, die darauffolgend gemessenen Ankunftszeiten einer bestimmten Tendenz gehorchen. Die Annahme ist, dass nach einer kleinen Ankunftszeit bevorzugt kleine Ankunftszeiten oder große Ankunftszeiten gemessen werden. Um diese Annahme der zeitlichen Korrelation zu prüfen, wurden FLPM-Messungen an Menadion-behandelten HeLa-Zellen nach Kapitel 5.1.4 sowohl im Nukleoplasma als auch im Zytoplasma durchgeführt.

Korrelationen zwischen den Ankunftszeiten können auf verschiedenen Zeitskalen vorhanden sein. Während der Messung diffundieren die Farbstoffmoleküle durch das konfokale Volumen, dessen Radius durch das Rayleighsche Auflösungskriterium^[139] [Gl. (5.1)] angenähert werden kann:

$$r_n = \frac{0.61\lambda_{\text{ex}}}{\text{NA}} = 0.325 \mu\text{m}. \quad (5.1)$$

Hier bezeichnet r_n den Radius des konfokalen Volumens, $\lambda_{\text{ex}} = 640 \text{ nm}$ die Wellenlänge des Lasers und $\text{NA} = 1.4$ die numerische Apertur des Objektivs. Im ersten Schritt

ist es wichtig, eine Abschätzung für die Zeitskalen zu treffen, auf der nach Korrelationen gesucht werden soll. Als Kriterium für die Wahl der Zeitskalen wird die mittlere Transitzeit der Fluorophore durch das konfokale Volumen, bestimmt durch das mittlere Verschiebungsquadrat [MSD (*mean squared displacement*)] für zweidimensionale normale Diffusion [Gl. (5.2)]^[140] verwendet.

$$\text{MSD}(t) = \langle r(t) \rangle^2 = 4D_{\text{diff}}t \quad (5.2)$$

In Gl. (5.2) bezeichnet t die Laborzeit, D_{diff} die Diffusionskonstante von CellRox-DeepRed und $r(t)$ die im Mittel zurückgelegte Strecke nach der Zeit t . Die zurückgelegte Strecke wird auf $r(t) = 2r_n$ festgelegt. Da die Diffusionskonstante von CellRox-DeepRed unbekannt ist, muss eine Annahme bezüglich der Transitzeit getroffen werden, die auf höchstens $\Delta t = 100 \mu\text{s}$ festgelegt wurde. Nach Gl. (5.2) ergibt dies eine maximale Diffusionskonstante $D_{\text{diff,max}}$, die CellRox-DeepRed nicht überschreiten sollte:

$$D_{\text{diff,max}} = 1056 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$$

Im Folgenden werden die gemessenen Ankunftszeiten der Zeitreihe $\tau_A(t)$ wie in Abb. 5.3 gezeigt in Zeitfenster der Breite $\Delta t = 100 \mu\text{s}$ linear zur Laborzeit t eingeteilt. Die jeweils erste Ankunftszeit $\tau_{A,i}$ in dem Zeitfenster bestimmt das i -te Fenster. Den gemessenen Ankunftszeiten in den Zeitfenstern $\tau_{A,i}$ der Breite Δt wird der Mittelwert $\langle \tau_A \rangle$ und die Standardabweichung σ zugewiesen.

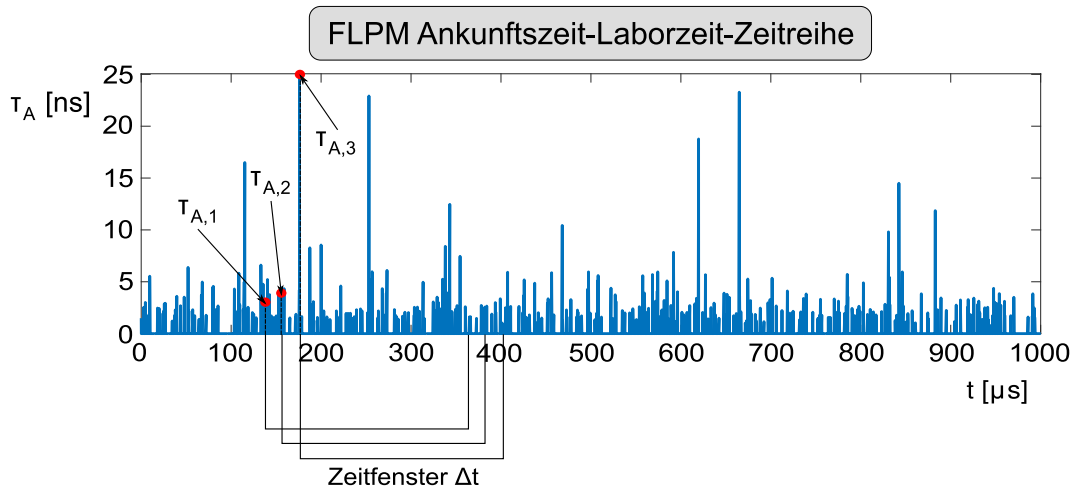


Abbildung 5.3.: FLPM-Messung - CellRox-DeepRed - Laborzeit-Ankunftszeit-Zeitreihe $\tau_A(t)$. Die Abbildung zeigt die Auswahl der Zeitfenster mit der jeweils ersten Lebenszeit $\tau_{A,i}$. Der Graph zeigt die erste Millisekunde ($1000 \mu\text{s}$) einer FLPM-Messung. Der Wertebereich $\Delta\tau_A$ zwischen $0 - 25 \text{ ns}$ wird durch die Pulsfrequenz $f_{\text{ex}} = 40 \text{ MHz}$ des Lasers vorgegeben. Die Auflösung der Zeitreihe beträgt $\delta t = 100 \text{ ns}$. Dies entspricht in etwa der Totzeit des SPAD. Bei dieser hohen Zeitauflösung entsteht nur selten der Fall, dass zwei Photonen im selben Zeitinkrement δt gemessen werden. Wurden trotzdem zwei oder mehr Photonen im selben Zeitinkrement gemessen, wird nur die erste Ankunftszeit verwendet. Die Breite der Zeitfenster Δt kann frei gewählt werden, in der Auswertung wurde sie auf $\Delta t = 100 \mu\text{s}$, $\Delta t = 10 \mu\text{s}$ oder $\Delta t = 1 \mu\text{s}$ gesetzt. Die aufeinanderfolgenden $\tau_{A,1}$, $\tau_{A,2}$ und $\tau_{A,3}$, in der Abbildung durch rote Punkte gekennzeichnet, nummerieren aufsteigend die erste Lebenszeit $\tau_{A,i}$ der Zeitfenster 1, 2 und 3.

Trägt man nun $\langle\tau_A\rangle$ gegen $\tau_{A,i}$ auf, erhält man für ROI₁ im Nukleoplasma und ROI₂ im Zytoplasma die beiden Graphen in Abb. 5.4.

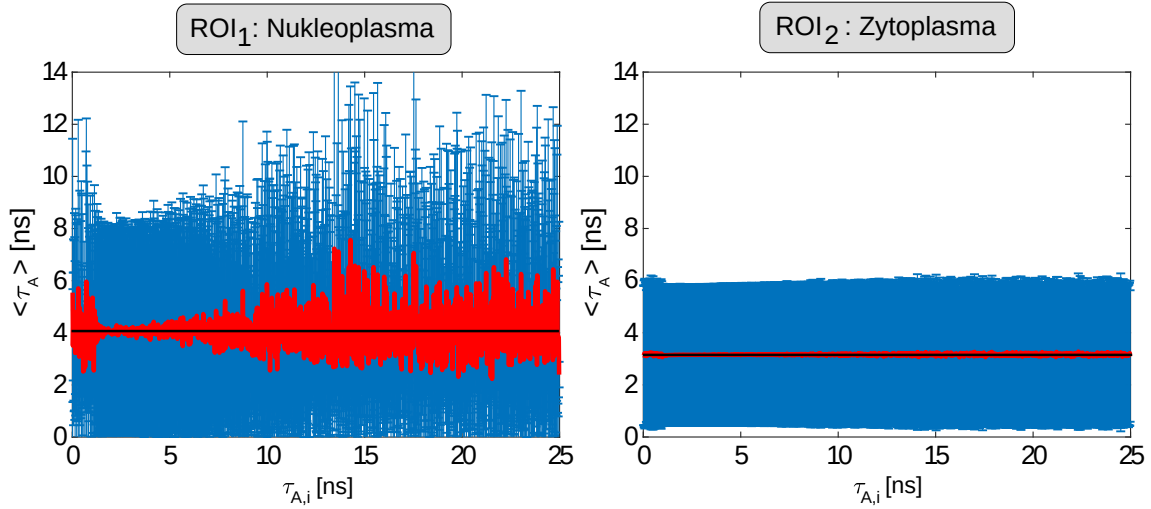


Abbildung 5.4.: Ankunftszeit-Ankunftszeit-Korrelation der CellRox-DeepRed Photonenankunftszeiten ($\langle\tau_A\rangle(\tau_{A,i})$). Gezeigt ist die mittlere Ankunftszeit $\langle\tau_A\rangle$ der $\Delta t = 100 \mu\text{s}$ Zeitfenster, wobei die $\tau_{A,i}$ aufsteigend sortiert sind. Der Mittelwert $\langle\tau_A\rangle$ ist rot, die Standardabweichung der Zeitfenster σ ist blau dargestellt. **Links:** Auswertung der FLPM-Messung im Nukleoplasma, (ROI₁ in Abb. 5.2). **Rechts:** Auswertung der FLPM-Messung im Zytoplasma (ROI₂ in Abb. 5.2). Die schwarze horizontale Linie in beiden Graphen ist diejenige Ankunftszeit $\langle\langle\tau_A\rangle\rangle_{\tau_A}$, um die die Funktion $\langle\tau_A\rangle(\tau_{A,i})$ fluktuiert. Im Nukleoplasma erhält man $\langle\langle\tau_A\rangle\rangle_{\tau_A} \approx 4 \text{ ns}$, im Zytoplasma $\langle\langle\tau_A\rangle\rangle_{\tau_A} \approx 3 \text{ ns}$. Die Fluktuationen sind im Nukleoplasma deutlich größer als im Zytoplasma, da CellRox-DeepRed das Nukleoplasma nur schwach färbt. Man erkennt weder im Zytoplasma noch im Nukleoplasma einen systematischen Zusammenhang zwischen $\tau_{A,i}$ und $\langle\langle\tau_A\rangle\rangle_{\tau_A}$.

Die mittleren Photonenankunftszeiten, bezogen auf den Nullpunkt des Ankunftszeithistogrammes $\tau_A = 0 \text{ ns}$, können für das Nukleoplasma zu $\langle\langle\tau_A\rangle\rangle_{\tau_A} \approx 4 \text{ ns}$ und im Zytoplasma zu $\langle\langle\tau_A\rangle\rangle_{\tau_A} \approx 3 \text{ ns}$ bestimmt werden. Da die Lokalisation des Farbstoffes laut Hersteller auf den zytoplasmischen Bereich begrenzt ist^[64], kann die Messung im Nukleoplasma als Kontrollmessung aufgefasst werden.

Die beschriebene Korrelationsuntersuchung wurde auch für Zeitfenster der Breite $\Delta t = 10 \mu\text{s}$ und $\Delta t = 1 \mu\text{s}$ durchgeführt. Unter der Annahme, dass $D_{\text{diff}} < D_{\text{diff,max}}$ gilt, repräsentieren die letzten beiden Zeitfensterbreiten den quasistatischen Zustand von CellRox-DeepRed während der FLPM-Messung. Ein statistischer Zusammenhang zwischen einer beliebigen ersten Ankunftszeit $\tau_{A,i}$ und dem Mittelwert darauffolgender Ankunftszeiten $\langle\tau_A\rangle$ in den getesteten Zeitfenstern konnte nicht nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass der zeitliche Aufbau des Ankunftszeithistogrammes von CellRox-DeepRed ein markovscher Prozess^[141] auf den untersuchten raumzeitlichen Skalen ist. Die Reihenfolge der Photonenankunftszeiten kann im Falle von CellRox-DeepRed also nicht vorhergesagt werden.

5.3. Intensitätscharakteristik der Stressantwort

Wesentliche Ergebnisse

Die oxidative Stresszunahme durch die Menadion-Behandlung ist in HeLa- und U2OS-Zellen durch die Intensitätserhöhung von CellRox-DeepRed nachweisbar. Diese Intensitätserhöhung kann durch die Erhöhung der Zahl aktivierter Sensormoleküle erklärt werden.

Ob Menadion eine wesentliche Zunahme oxidativen Stresses und damit einen messbaren Effekt auf die Intensität von CellRox-DeepRed hat, wird in diesem Kapitel über Fluoreszenzmikroskopieexperimente ermittelt. Hierfür wurden sowohl HeLa- wie auch U2OS-Zellen gemäß Kapitel 5.1.1 behandelt und nach Kapitel 5.1.2 unter einheitlichen Bedingungen gemessen. Für die Auswertung der Intensitätserhöhung durch die Menadion-Behandlung wurde die Ensemblegröße N_{cell} in Tab. 5.1 verwendet. Der Hintergrund der Intensität wurde bei $N_{\text{phot}} = 5$ für die Auswertung abgeschnitten. Alle Pixelwerte, die heller waren, wurden gemittelt, um so eine mittlere pixelweise Intensität pro Zelle I_{av} zu erhalten und die Zelle zuverlässig vom Hintergrund zu trennen. Das Ensembledittel $\langle I_{\text{av}} \rangle_{\text{E}}$ mit dem Fehler des Ensembledittelwertes s_{E} ist in Tab. 5.4 angegeben. Die prozentuale Intensitätserhöhung $\Delta \langle I_{\text{av}} \rangle$ kann über Gl. (5.3) mit den Indizes **T**: für Menadion-behandelte Zellen und **U**: für unbehandelte Zellen berechnet werden.

$$\Delta \langle I_{\text{av}} \rangle = \left(\frac{\langle I_{\text{av}} \rangle_{\text{E,T}}}{\langle I_{\text{av}} \rangle_{\text{E,U}}} - 1 \right) \times 100 \% \quad (5.3)$$

INTENSITÄT TEST	U $\langle I_{\text{av}} \rangle_{\text{E}} \pm s_{\text{E}}$	T $\langle I_{\text{av}} \rangle_{\text{E}} \pm s_{\text{E}}$	T/U-1 $\Delta \langle I_{\text{av}} \rangle [\%]$
HeLa	21 ± 1	27 ± 2	$\approx 28 \%$
U2OS	26 ± 1	30 ± 1	$\approx 15 \%$

Tabelle 5.4.: Intensitätsspezifität von CellRox-DeepRed in HeLa- und U2OS-Zellen. Gezeigt sind mittlere pixelweise Intensitätswerte $\langle I_{\text{av}} \rangle_{\text{E}}$. s_{E} ist der Fehler des Ensembledittelwertes. **U**: unbehandelte Zellen, **T**: Menadion-behandelte Zellen. Die prozentuale Intensitätserhöhung wurde über Gl. (5.3) berechnet. In beiden Zelltypen ist eine Intensitätserhöhung von CellRox-DeepRed nachweisbar. In HeLa-Zellen ist die Zunahme der mittleren Intensität höher als in U2OS-Zellen.

Das Ergebnis der intensitätsspezifischen Untersuchung von CellRox-DeepRed zeigt sowohl bei HeLa- als auch bei U2OS-Zellen eine Intensitätserhöhung $\Delta \langle I_{\text{av}} \rangle$ unter Menadion-Behandlung. Die Intensitätserhöhung je Zelltyp ist in Tab. 5.4 gezeigt und ist bei HeLa-Zellen größer als bei U2OS-Zellen. Hiermit ist die Aktivierung von CellRox-DeepRed durch ROS nachgewiesen und quantifiziert.

5.4. Lebenszeitcharakteristik der Stressantwort

In diesem Kapitel wird mit Hilfe der doppel-exponentiellen Kurvenanpassung [Kapitel 3.2.2] und der Phasor-Analyse [Kapitel 3.2.3] untersucht, ob CellRox-DeepRed neben der bereits nachgewiesenen Intensitätserhöhung [Kapitel 5.3] auch mit einer Lebenszeitverschiebung auf zunehmenden oxidativen Stress reagiert.

Es zeigt sich, dass die Resultate empfindlich von der Auswertemethode abhängen, da die gemessenen Reaktionen in allen Fällen gering sind. Ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Verteilungen der Menadion-behandelten Zellen und der unbehandelten Zellen vorliegt, wurde über Signifikanztests geprüft. Als Signifikanztests werden der Kolmogorow-Smirnow- und der Wilcoxon-Ranksum-Test bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0.01$ verwendet. Hierbei muss festgehalten werden, dass ein signifikanter Unterschied zwar einen tatsächlichen, wesentlichen Unterschied bedeutet, die fehlende Signifikanz jedoch zur Bewertung der tatsächlichen Unterscheidbarkeit im Allgemeinen nicht ausreicht und weiterer Überprüfung bedarf. Da jedoch in Fällen fehlender Signifikanz gleichzeitig die Verteilungen der Auswertegrößen wesentlich überlappen und in der überwiegenden Zahl der Fälle beide Signifikanztests einheitlich bewerten, wird geschlossen, dass die fehlende Signifikanz gleichzeitig die fehlende Unterscheidbarkeit bedeutet.

5.4.1. Analyse über doppel-exponentielle Kurvenanpassung

Wesentliche Ergebnisse

Die Auswertung über die doppel-exponentielle Kurvenanpassung ergibt, dass in HeLa-Zellen eine signifikante Erhöhung der CellRox-DeepRed-Lebenszeiten nach der Menadion-Behandlung beobachtet werden kann. In U2OS-Zellen sind wesentliche Änderungen der Auswertegrößen über diese Methode nicht nachweisbar.

Die Auswertung der Ankunftszeithistogramme über die doppel-exponentielle Kurvenanpassung verwendet das Modell Gl. (3.4). Histogrammiert wurden diejenigen Lebenszeiten $\tau_{1,2}$, deren Verlaufskurve die Residuenfunktion $R(m)$ [Gl. (3.5)] minimiert haben. Für die Fraktionsanalyse λ_i der τ_i werden die Vorfaktoren f_i und Lebenszeiten τ_i aus der Kurvenanpassung gemäß Gl. (5.4) verknüpft, sodass die Fraktion λ_i direkt proportional zum Integral über das jeweilige Ankunftszeithistogramm mit den Parametern f_i und τ_i ist. Die Mittelwerte der Lebenszeiten τ_1 , τ_2 , die paarweisen Lebenszeitdifferenzen $\tau_2 - \tau_1$ und die Fraktionen λ_1 der kleineren Lebenszeit τ_1 sind in Tab. 5.5 zusammengefasst. Die Verteilungen genannter Auswertegrößen sind in Abb. 5.5 für HeLa- und in Abb. 5.6 für U2OS-Zellen gezeigt und bilden die Grundlage für die Beschreibung der Auswertegrößen und ihr Verhalten unter der Menadion-Behandlung.

$$\lambda_i = \frac{f_i \tau_i}{f_1 \tau_1 + (1 - f_1) \tau_2}, \quad (5.4)$$

Man erkennt bei HeLa-Zellen in Abb. 5.5 und Tab. 5.5 bei beiden Lebenszeiten τ_1 und τ_2 die deutliche Verbreiterung der Verteilung unter Menadion-Behandlung, sowie die Verschiebung der Mittelwertes zu größeren Lebenszeiten. Die Verteilungen der paarweisen Lebenszeitdifferenzen $\tau_2 - \tau_1$ sind in unbehandelten und Menadion-behandelten HeLa-Zellen annähernd gleich. Die Menadion-Behandlung bewirkt eine leichte Erhöhung der Lebenszeitdifferenzen, die jedoch nicht signifikant ist. Dies bedeutet, dass bei Kenntnis und korrekter Zuweisung einer der beiden Lebenszeiten τ_1 oder τ_2 , die jeweils andere im Mittel vorhergesagt werden kann. Die Verteilung von λ_1 zeigt ebenfalls sowohl eine Verbreiterung der Verteilung, als auch eine Verschiebung des Mittelwertes zu größeren Werten. Damit kann festgehalten werden, dass die Menadion-Behandlung in HeLa-Zellen einen signifikanten Effekt zur Folge hat, der sich sowohl auf die Mittelwerte der Lebenszeiten als auch der Lebenszeitfraktionen von CellRox-DeepRed auswirkt, die paarweisen Lebenszeitdifferenzen jedoch nicht betrifft.

Bei der Auswertung der U2OS-Zellen in Abb. 5.6 und Tab. 5.5 zeigt sich jedoch ein anderes Bild. Man erkennt bei keiner der beiden Lebenszeitverteilungen τ_1 oder τ_2 eine Veränderung der Breite unter Menadion-Behandlung. Eine Mittelwertsverschiebung von τ_2 ist im Ansatz vorhanden, bei τ_1 nicht erkennbar und in beiden Fällen nicht signifikant. Auch die Verteilung der Lebenszeitdifferenzen zeigt keine wesentliche Änderung. Die Verteilung der Fraktion λ_1 zeigt keine Änderung der Breite, eine Verschiebung des Mittelwertes zu höheren Werten ist im Ansatz vorhanden.

Allgemein fällt auf, dass sämtliche als signifikant bewertete Änderungen der Lebenszeiten und Lebenszeitfraktionen unter Menadion-Behandlung positiv sind. Unter den nicht signifikanten Änderungen ist die einzig negative die Änderung der kleineren Lebenszeit $\Delta\tau_1$ in U2OS-Zellen, die jedoch nur etwa halb so groß wie der zugehörige Mittelwertsfehler ist.

DE-FIT	$\langle \tau_1 \rangle \pm s_E$ [ns]	$\langle \lambda_1 \rangle \pm s_E$	$\langle \tau_2 \rangle \pm s_E$ [ns]	$\langle \tau_2 - \tau_1 \rangle \pm s_E$ [ns]
HeLa U	0.811 ± 0.018	0.154 ± 0.013	1.476 ± 0.012	0.664 ± 0.012
HeLa T	0.906 ± 0.020	0.220 ± 0.014	1.606 ± 0.017	0.699 ± 0.014
Δ (T-U)	0.095 ± 0.026	0.066 ± 0.019	0.130 ± 0.021	0.035 ± 0.018
U2OS U	0.870 ± 0.015	0.169 ± 0.010	1.533 ± 0.009	0.664 ± 0.011
U2OS T	0.864 ± 0.010	0.197 ± 0.007	1.551 ± 0.006	0.687 ± 0.008
Δ (T-U)	-0.006 ± 0.018	0.028 ± 0.012	0.018 ± 0.011	0.023 ± 0.014

Tabelle 5.5.: Mittelwerte der behandlungs- und zelltypspezifischen Parameter von CellRox-DeepRed - doppel-exponentielle Kurvenanpassung (DE-Fit). Diese Tabelle fasst die Ergebnisse aus Abb. 5.5 und Abb. 5.6 zusammen. Gezeigt sind die gemittelten Lebenszeiten $\langle \tau_1 \rangle$, $\langle \tau_2 \rangle$ mit dem zugehörigen Fehler des Mittelwertes s_E der HeLa- und U2OS-Zellen aus der Auswertung mittels doppel-exponentieller Kurvenanpassung (**DE-Fit**) sowie die mittlere Fraktion $\langle \lambda_1 \rangle$ der Lebenszeit $\langle \tau_1 \rangle$ ebenfalls mit zugehörigem Fehler s_E . $\langle \tau_2 - \tau_1 \rangle$ ist die paarweise gemittelte Differenz der beiden Lebenszeiten. **U**: unbehandelte und **T**: Menadion-behandelte Zellen. Δ bezeichnet den Unterschied der Lebenszeiten- und Fraktionen zwischen unbehandelten und Menadion-behandelten Zellen. **Rot** sind diejenigen Unterschiede in $\langle \tau_1 \rangle$, $\langle \tau_2 \rangle$, $\langle \lambda_1 \rangle$ und $\langle \tau_2 - \tau_1 \rangle$ hervorgehoben, die sowohl vom Kolmogorow-Smirnow- als auch vom Wilcoxon-Ranksum-Test bei $\alpha = 0.01$ als signifikant bewertet wurden. Im Falle von HeLa-Zellen zeigen sowohl $\langle \tau_1 \rangle$ als auch $\langle \tau_2 \rangle$ eine signifikante Erhöhung des Mittelwertes, wobei die Erhöhung bei $\langle \tau_2 \rangle$ größer als bei $\langle \tau_1 \rangle$ ist. Auch die Fraktion $\langle \lambda_1 \rangle$ nimmt signifikant zu. Im Falle von U2OS-Zellen ist weder bei den Lebenszeiten $\langle \tau_1 \rangle$, $\langle \tau_2 \rangle$ noch bei der Lebenszeitfraktion $\langle \lambda_1 \rangle$ eine signifikante Änderung über die doppel-exponentielle Kurvenanpassung feststellbar. Die gemessenen Änderungen sind in der Größenordnung der Fehler oder sogar, wie im Fall von $\langle \tau_1 \rangle$ negativ. Die paarweise zeitliche Distanz $\langle \tau_2 - \tau_1 \rangle$ ist bei beiden Zelltypen, sowohl bei Menadion-behandelten als auch bei unbehandelten, im Rahmen der angegebenen Fehler. Die Verteilungen von $\tau_2 - \tau_1$ wurden in allen Fällen sowohl vom Kolmogorow-Smirnow- als auch vom Wilcoxon-Ranksum-Test bei $\alpha = 0.01$ als derselben Grundgesamtheit zugehörig bewertet.

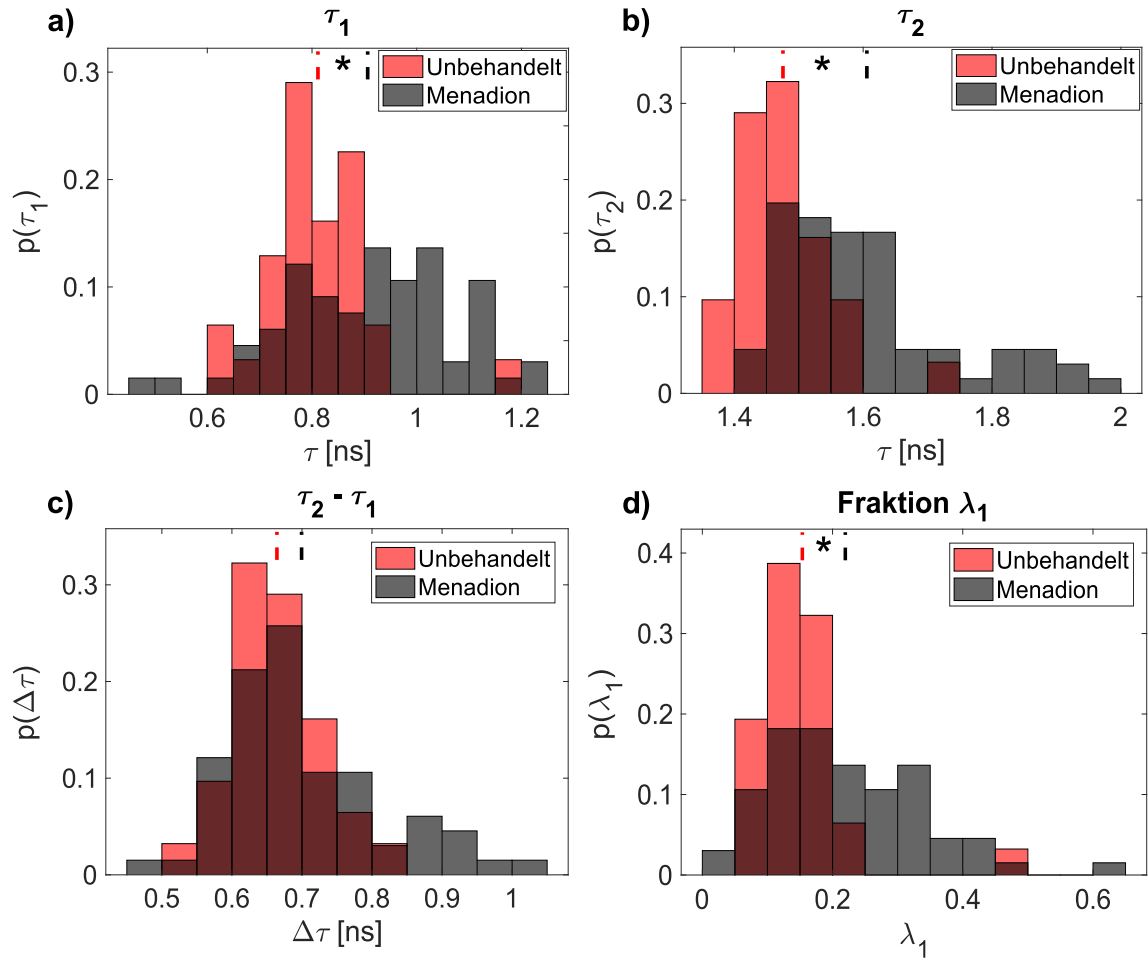


Abbildung 5.5.: Verteilungen der CellRox-DeepRed-Parameter in HeLa-Zellen, ausgewertet über die doppel-exponentielle Kurvenanpassung (DE-Fit). Gezeigt sind die Verteilungen der Lebenszeiten **a)** τ_1 , **b)** τ_2 , deren Paardifferenzen: **c)** $\tau_2 - \tau_1$ und die Verteilung der Fraktionen **d)** λ_1 der kleineren Lebenszeit τ_1 in unbehandelten und Menadion-behandelten HeLa-Zellen, gewonnen über die Auswertung mittels doppel-exponentieller Kurvenanpassung (DE-Fit). Die Balkenbreite der Histogramme beträgt $\delta\tau_{1,2} = 0.05$ ns, $\delta(\tau_2 - \tau_1) = 0.05$ ns und $\delta\lambda_1 = 0.05$. Zu den Verteilungen tragen $N_{\text{cell,U}} = 31$ unbehandelte und $N_{\text{cell,T}} = 67$ Menadion-behandelte HeLa-Zellen bei. Rot ist die Verteilung unbehandelter Zellen, grau die Verteilung Menadion-behandelter Zellen gezeigt. Bordeauxrot zeigt sich der Überlapp beider Verteilungen, Lebenszeiten und Fraktionen, die sowohl Teil der Grundgesamtheit behandelter als auch unbehandelter HeLa-Zellen sind. Alle Verteilungen sind auf den Integralwert eins normiert. Die Mittelwerte sind durch farbige, senkrechte, gestrichelte Linien in den Graphen angezeigt. Die Mittelwerte der Lebenszeiten vor (**U**) und nach (**T**) der Menadion-Behandlung sind $\langle\tau_1\rangle_{\text{U}} = 0.81 \pm 0.02$ ns, $\langle\tau_1\rangle_{\text{T}} = 0.91 \pm 0.02$ ns, $\langle\tau_2\rangle_{\text{U}} = 1.48 \pm 0.01$ ns, $\langle\tau_2\rangle_{\text{T}} = 1.61 \pm 0.02$ ns. Der Mittelwert der paarweisen Lebenszeitdifferenzen beträgt $\langle\tau_2 - \tau_1\rangle_{\text{U}} = 0.66 \pm 0.01$ ns und $\langle\tau_2 - \tau_1\rangle_{\text{T}} = 0.69 \pm 0.01$ ns. Die Mittelwerte der Fraktion λ_1 sind $\langle\lambda_1\rangle_{\text{U}} = 0.15 \pm 0.01$ und $\langle\lambda_1\rangle_{\text{T}} = 0.22 \pm 0.01$. Der angegebene Fehler ist der Fehler des Ensemblemittelwertes s_E . Ein Stern markiert den signifikanten Unterschied durch die Menadion-Behandlung bei $\alpha = 0.01$ sowohl über den Kolmogorow-Smirnow- als auch den Wilcoxon-Ranksum-Test. Die Zusammenfassung der Mittelwerte und Mittelwertsdifferenzen ist in Tab. 5.5 gezeigt.

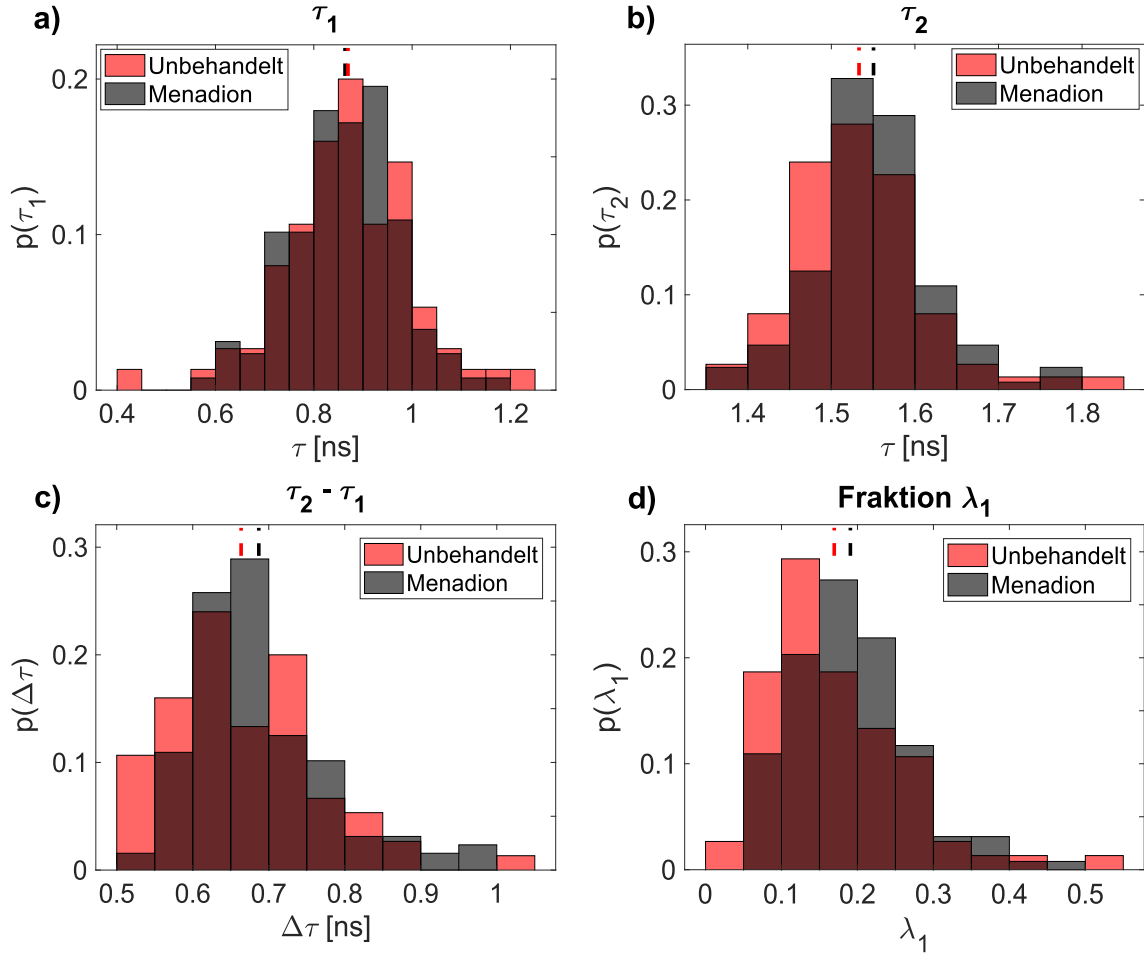


Abbildung 5.6.: Verteilungen der CellRox-DeepRed-Parameter in U2OS-Zellen, ausgewertet über die doppel-exponentielle Kurvenanpassung (DE-Fit). Gezeigt sind die Verteilungen der Lebenszeiten **a)** τ_1 , **b)** τ_2 , die Verteilungen der paarweisen Lebenszeitdifferenzen **c)** $\tau_2 - \tau_1$ und die Verteilung der Fraktionen **d)** λ_1 der kleineren Lebenszeit τ_1 in unbehandelten und Menadion-behandelten U2OS-Zellen, gewonnen über die Auswertung mittels doppel-exponentieller Kurvenanpassung (DE-Fit). Die Balkenbreite der Histogramme beträgt $\delta\tau_{1,2} = 0.05$ ns, $\delta(\tau_2 - \tau_1) = 0.05$ ns und $\delta\lambda_1 = 0.05$. Zu den Verteilungen tragen $N_{\text{cell,U}} = 76$ unbehandelte und $N_{\text{cell,T}} = 128$ Menadion-behandelte U2OS-Zellen bei. Rot ist die Verteilung unbehandelter Zellen, grau die Verteilung Menadion-behandelter Zellen gezeigt. Bordeauxrot zeigt sich der Überlapp beider Verteilungen, Lebenszeiten und Fraktionen, die sowohl Teil der Grundgesamtheit behandelter als auch unbehandelter U2OS-Zellen sind. Alle Verteilungen sind auf den Integralwert eins normiert. Die Mittelwerte sind durch farbige, senkrechte, gestrichelte Linien in den Graphen angezeigt. Die Mittelwerte der Lebenszeiten vor (**U**) und nach (**T**) der Menadion-Behandlung sind $\langle\tau_1\rangle_{\text{U}} = 0.87 \pm 0.02$ ns, $\langle\tau_1\rangle_{\text{T}} = 0.86 \pm 0.02$ ns, $\langle\tau_2\rangle_{\text{U}} = 1.53 \pm 0.01$ ns, $\langle\tau_2\rangle_{\text{T}} = 1.55 \pm 0.01$ ns. Die Mittelwerte der paarweisen Lebenszeitdifferenzen sind $\langle\tau_2 - \tau_1\rangle_{\text{U}} = 0.66 \pm 0.01$ ns und $\langle\tau_2 - \tau_1\rangle_{\text{T}} = 0.69 \pm 0.01$ ns. Die Mittelwerte der Fraktion λ_1 sind $\langle\lambda_1\rangle_{\text{U}} = 0.17 \pm 0.01$ und $\langle\lambda_1\rangle_{\text{T}} = 0.20 \pm 0.01$. Der angegebene Fehler ist der Fehler des Ensemblemittelwertes s_E . Die Zusammenfassung der Mittelwerte und Mittelwertsdifferenzen ist in Tab. 5.5 gezeigt.

5.4.2. Phasor-Analyse

Wesentliche Ergebnisse

Die Auswertung über Phasor ergibt, dass HeLa-Zellen eine signifikante Änderung der CellRox-DeepRed-Lebenszeiten nach der Menadion-Behandlung zeigen: Die kleinere Lebenszeit verringert sich unter Menadion-Behandlung, die größere erhöht sich. Damit ist das Ergebnis im Hinblick auf die doppel-exponentielle Kurvenanpassung nicht konsistent. Wesentliche Änderungen der Auswertegrößen sind in U2OS-Zellen auch über Phasor nicht nachzuweisen.

Die Auswertung über Phasor scheint auf den ersten Blick die einfachere Wahl zu sein, um die Lebenszeiten $\tau_{1,2}$ aus FLIM-Daten zu gewinnen, da ein definierter Algorithmus zwischen Ein- und Ausgabe zur Verfügung steht [Kapitel 5.4.2]. Die Problematik bei dieser Analyse liegt aber darin, dass die Fehler der resultierenden Phasorpunkte vom SNR der pixelweisen Ankunftszeithistogramme und damit von der lokalen Helligkeit der Probe abhängen. Da aber strukturbedingt Helligkeitsunterschiede in den Fluoreszenzbildern lebender Zellen vorhanden sind, existiert ein genauso breites Fehlerspektrum wie das Helligkeitsspektrum des aufgenommenen FLIM-Bildes. Deshalb ist es für die Phasorauswertung nötig, nur diejenigen pixelweisen Histogramme auszuwählen, die zur untersuchten Struktur gehören und damit einen Mindesthelligkeitswert besitzen. Die Auswahl über eine Maske ist beispielhaft in Abb. 5.1 gezeigt.

In dieser Analyse wird für jeden Pixel der ausgewählten Region ein Ankunftszeithistogramm erstellt und über Phasor ausgewertet. Damit besteht das Phasorhistogramm aus ebensovielen Einzeleinträgen wie Pixel der Zelle ausgewertet werden. Für die Auswertung werden die ersten $N_h = 512$ Einträge der Ankunftszeithistogramme nach dem detektierten Histogrammmaximum bei $\tau_{A,\max}$ verwendet. Das verwendete Zeitintervall entspricht somit $T_{\text{ex}} \approx 8 \text{ ns}$. Die Histogramme werden zusätzlich, wegen des niedrigen SNR, mit dem Parameter $N_s = 20$ geglättet.

Da sehr viele Phasorpunkte nicht auf der Regressionsgerade liegen und eine Projektion dieser Punkte auf die Regressionsgerade nicht ohne tiefergehende Annahmen möglich ist, werden zur Bestimmung der Fraktionsbeiträge λ_1 die Phasorschnitte verwendet und deren Maximum bei $\lambda_{1,\max}$ ausgewertet. Die Fraktion $\lambda_{1,\max}$ bei der Phasorauswertung entspricht damit nicht der mittleren Fraktion $\langle \lambda_1 \rangle$, die bei der doppel-exponentiellen Kurvenanpassung zugänglich ist.

Bei der Phasorauswertung wird die maximale Fraktion der kleineren Lebenszeit $\lambda_{1,\max}$ aus den Fraktionsbeiträgen entlang der Regressionsgerade nach Kapitel 3.2.3 [Abb. 3.7] ermittelt. Um diese Fraktion zu bestimmen, werden die Phasorschnitte entlang der linearen Regressionsgerade abgetastet und der Abstand von der größeren Lebenszeit τ_2

zum Maximum der Phasorschnitte, geteilt durch den Abstand zwischen den Lebenszeiten τ_2 und τ_1 als Beitrag $\lambda_{1,\max}$ der Lebenszeit τ_1 , verwendet.

Die Verteilungen der Lebenszeiten $\tau_{1,2}$, Lebenszeitdifferenzen $\tau_2 - \tau_1$ und maximalen Fraktionen der kleineren Lebenszeit $\lambda_{1,\max}$ sind für HeLa-Zellen in Abb. 5.7 und für U2OS-Zellen in Abb. 5.8 gezeigt. Die Mittelwerte und Mittelwertsverschiebungen sind in Tab. 5.6 zusammengefasst und bilden die Grundlage für die Beschreibung der Auswertegrößen und deren Verhalten unter Menadion-Behandlung.

Man erkennt in Abb. 5.7 und Tab. 5.6 bei beiden Lebenszeiten τ_1 und τ_2 in HeLa-Zellen eine Verbreiterung der Verteilung unter Menadion-Behandlung, wie auch eine Verschiebung des Mittelwertes. Die Verbreiterung der Verteilungen ist bei τ_2 und $\tau_2 - \tau_1$ deutlich, bei τ_1 schwächer. Bei τ_1 ist die Verschiebung des Mittelwertes unter Menadion-Behandlung negativ, bei τ_2 positiv. Beide Verschiebungen werden einheitlich von beiden Signifikanztests als wesentlich eingestuft. Die paarweisen Lebenszeitdifferenzen $\tau_2 - \tau_1$ verschieben sich unter Menadion-Behandlung bei der Phasor-Auswertung im Gegensatz zur doppel-exponentiellen Kurvenanpassung signifikant zu größeren Werten. Die Verteilung der maximalen Fraktionen $\lambda_{1,\max}$ zeigt keine Auffälligkeiten, weder eine Verbreiterung noch eine Verschiebung des Mittelwertes und wird auch von den Signifikanztests als nicht wesentlich bewertet.

In Abb. 5.8 und Tab. 5.6 erkennt man bei keiner der beiden Lebenszeitverteilungen τ_1 und τ_2 eine signifikante Veränderung der Breite unter Menadion-Behandlung in U2OS-Zellen. Mittelwertsverschiebungen sind sowohl bei τ_1 , τ_2 , $\lambda_{1,\max}$ als auch bei $\tau_2 - \tau_1$ erkennbar, aber nur bei τ_1 und $\tau_2 - \tau_1$ signifikant. Die Verschiebung von τ_2 wird nur vom Wilcoxon-Ranksum-Test als signifikant bewertet. Die Verteilung der maximalen Fraktion $\lambda_{1,\max}$ zeigt ansatzweise eine Verschmälerung der Breite unter Menadion-Behandlung. Eine Verschiebung des Mittelwertes zu höheren $\lambda_{1,\max}$ ist im Ansatz vorhanden, ist jedoch nicht signifikant.

Die Phasor-Auswertung zeigt, dass die Fraktionen $\lambda_{1,\max}$ der Lebenszeiten τ_1 weder in HeLa- noch in U2OS-Zellen behandlungsübergreifend signifikant unterschiedlich sind. Dies ist bereits anhand der Fehler s_E sichtbar, die sich in der Größenordnung der Änderung $\Delta\lambda_{1,\max}$ befinden.

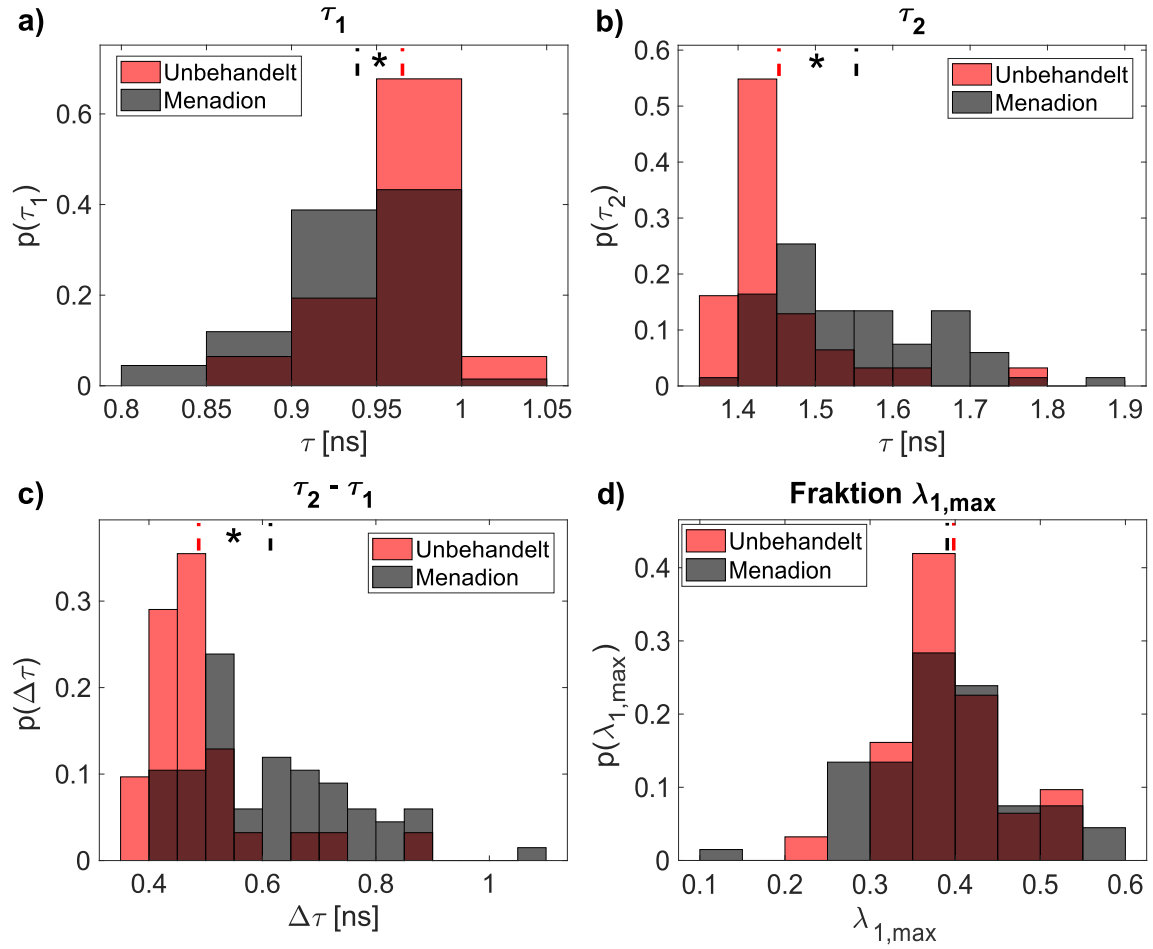


Abbildung 5.7.: Verteilungen der CellRox-DeepRed-Parameter in HeLa-Zellen, ausgewertet über Phasor. Gezeigt sind die Verteilungen der Lebenszeiten **a)** τ_1 , **b)** τ_2 , die paarweisen Lebenszeitdifferenzen **c)** $\tau_2 - \tau_1$ und die Verteilung der maximalen Fraktionen **d)** $\lambda_{1,\max}$ der kleineren Lebenszeit τ_1 in unbehandelten und Menadion-behandelten **HeLa**-Zellen, gewonnen über die Auswertung mittels Phasor. Die Balkenbreite der Histogramme beträgt $\delta\tau_{1,2} = 0.05$ ns, $\delta(\tau_2 - \tau_1) = 0.05$ ns und $\delta\lambda_1 = 0.05$. Zu den Verteilungen haben $N_{\text{cell,U}} = 31$ unbehandelte und $N_{\text{cell,T}} = 67$ Menadion-behandelte HeLa-Zellen beigetragen. Rot ist die Verteilung unbehandelter Zellen, grau die Verteilung Menadion-behandelter Zellen gezeigt. Bordeauxrot zeigt sich der Überlapp beider Verteilungen, Lebenszeiten und Fraktionen, die sowohl Teil der Grundgesamtheit behandelter als auch unbehandelter HeLa-Zellen sind. Alle Verteilungen sind auf den Integralwert eins normiert. Die Mittelwerte sind durch farbige, senkrechte, gestrichelte Linien in den Graphen gezeigt. Die Mittelwerte der Lebenszeiten in unbehandelten (**U**) und Menadion-behandelten (**T**) Zellen sind $\langle\tau_1\rangle_{\text{U}} = 0.97 \pm 0.01$ ns, $\langle\tau_1\rangle_{\text{T}} = 0.94 \pm 0.01$ ns, $\langle\tau_2\rangle_{\text{U}} = 1.45 \pm 0.01$ ns, $\langle\tau_2\rangle_{\text{T}} = 1.55 \pm 0.01$ ns. Die Mittelwerte der paarweisen Lebenszeitdifferenzen sind $\Delta(\tau_2 - \tau_1)_{\text{U}} = 0.49 \pm 0.02$ ns und $\Delta(\tau_2 - \tau_1)_{\text{T}} = 0.61 \pm 0.02$ ns. Die Mittelwerte der maximalen Fraktion $\lambda_{1,\max}$ sind $\langle\lambda_{1,\max}\rangle_{\text{U}} = 0.40 \pm 0.01$ und $\langle\lambda_{1,\max}\rangle_{\text{T}} = 0.39 \pm 0.01$. Ein Stern markiert den signifikanten Unterschied durch die Menadion-Behandlung bei $\alpha = 0.01$ sowohl über den Kolmogorow-Smirnow- als auch den Wilcoxon-Ranksum-Test. Die Zusammenfassung der Mittelwerte und Mittelwertsdifferenzen ist in Tab. 5.6 gezeigt.

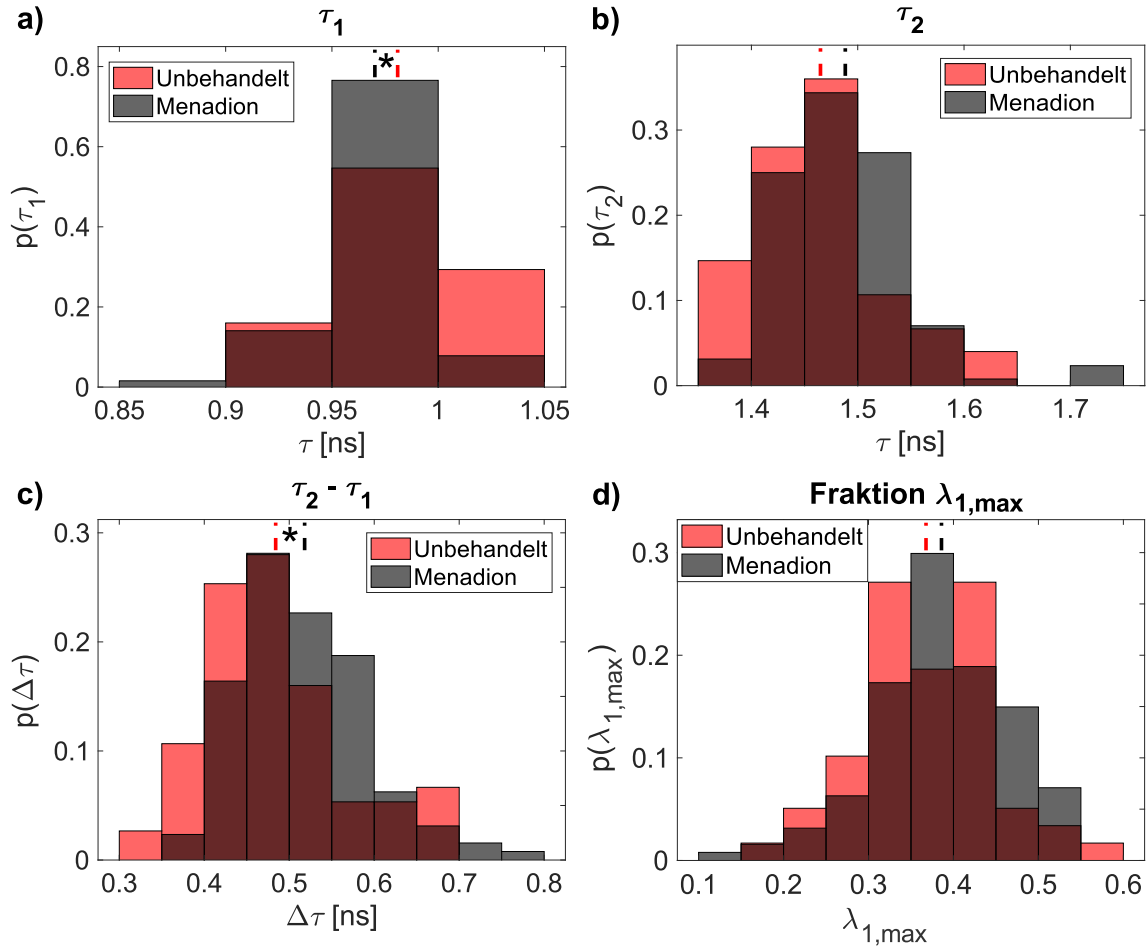


Abbildung 5.8.: Verteilungen der CellRox-DeepRed-Lebenszeiten in U2OS-Zellen, ausgewertet über Phasor. Gezeigt sind die Verteilungen der Lebenszeiten **a)** τ_1 , **b)** τ_2 , die Verteilung der paarweisen Lebenszeitdifferenzen **c)** $\tau_2 - \tau_1$ und die Verteilung der maximalen Fraktionen **d)** $\lambda_{1,\max}$ der kleineren Lebenszeit τ_1 in unbehandelten und Menadion-behandelten **U2OS**-Zellen, gewonnen über die Auswertung mittels Phasor. Die Balkenbreite der Histogramme beträgt $\delta\tau_{1,2} = 0.05 \text{ ns}$, $\delta(\tau_2 - \tau_1) = 0.05 \text{ ns}$ und $\delta\lambda_{1,\max} = 0.05$. Zu den Verteilungen haben $N_{\text{cell,U}} = 76$ unbehandelte und $N_{\text{cell,T}} = 128$ Menadion-behandelte U2OS-Zellen beigetragen. Rot ist die Verteilung unbehandelter Zellen, grau die Verteilung Menadion-behandelter Zellen gezeigt. Bordeaux-rot zeigt sich der Überlapp beider Verteilungen, Lebenszeiten und Fraktionen, die sowohl Teil der Grundgesamtheit behandelter als auch unbehandelter U2OS-Zellen sind. Alle Verteilungen sind auf den Integralwert eins normiert. Die Mittelwerte sind durch farbige, senkrechte, gestrichelte Linien in den Graphen angezeigt. Die Mittelwerte der Lebenszeiten in unbehandelten (**U**) und Menadion-behandelten (**T**) Zellen sind $\langle\tau_1\rangle_{\text{U}} = 0.981 \pm 0.003 \text{ ns}$, $\langle\tau_1\rangle_{\text{T}} = 0.970 \pm 0.002 \text{ ns}$, $\langle\tau_2\rangle_{\text{U}} = 1.465 \pm 0.007 \text{ ns}$, $\langle\tau_2\rangle_{\text{T}} = 1.488 \pm 0.005 \text{ ns}$. Die Mittelwerte der paarweisen Lebenszeitdifferenzen sind $\langle\tau_2 - \tau_1\rangle_{\text{U}} = 0.484 \pm 0.009 \text{ ns}$ und $\langle\tau_2 - \tau_1\rangle_{\text{T}} = 0.518 \pm 0.006 \text{ ns}$. Die Mittelwerte der maximalen Fraktion λ_1 sind $\langle\lambda_{1,\max}\rangle_{\text{U}} = 0.368 \pm 0.010$ und $\langle\lambda_{1,\max}\rangle_{\text{T}} = 0.386 \pm 0.010$. Der angegebene Fehler ist der Fehler des Ensemblemittelwertes s_E . Ein Stern markiert den signifikanten Unterschied durch die Menadion-Behandlung bei $\alpha = 0.01$ sowohl über den Kolmogorow-Smirnow- als auch den Wilcoxon-Ranksum-Test. Die Zusammenfassung der Mittelwerte und Mittelwertsdifferenzen ist in Tab. 5.6 gezeigt.

PHASOR	$\langle \tau_1 \rangle \pm s_E$ [ns]	$\langle \lambda_{1,\max} \rangle \pm s_E$	$\langle \tau_2 \rangle \pm s_E$ [ns]	$\langle \tau_2 - \tau_1 \rangle \pm s_E$ [ns]
HeLa U	0.965 ± 0.005	0.398 ± 0.011	1.453 ± 0.014	0.487 ± 0.019
HeLa T	0.939 ± 0.005	0.391 ± 0.011	1.553 ± 0.013	0.614 ± 0.017
Δ (T-U)	-0.026 ± 0.007	-0.007 ± 0.016	0.100 ± 0.019	0.127 ± 0.025
U2OS U	0.981 ± 0.003	0.368 ± 0.010	1.465 ± 0.007	0.484 ± 0.009
U2OS T	0.970 ± 0.002	0.386 ± 0.010	1.488 ± 0.005	0.518 ± 0.006
Δ (T-U)	-0.011 ± 0.004	0.018 ± 0.014	0.023 ± 0.009	0.034 ± 0.011

Tabelle 5.6.: Phasorauswertung der CellRox-DeepRed-Parameter in HeLa- und U2OS-Zellen. Gezeigt sind die über Phasor ausgewerteten gemittelten Lebenszeiten $\langle \tau_1 \rangle$ und $\langle \tau_2 \rangle$ sowie die gemittelte Fraktion $\langle \lambda_1 \rangle$ von CellRox-DeepRed in Menadion-behandelten (**T**) und unbehandelten (**U**) HeLa- und U2OS-Zellen. $\langle \tau_2 - \tau_1 \rangle$ zeigt die paarweise Differenz der beiden Lebenszeiten τ_2 und τ_1 . **Rot** markierte Unterschiede werden sowohl vom Kolmogorow-Smirnow- als auch Wilcoxon-Ranksum-Test bei $\alpha = 0.01$ als signifikant bewertet. Bei U2OS-Zellen wird die Verschiebung von $\langle \tau_2 \rangle$ nur vom Wilcoxon-Ranksum-Test als signifikant bewertet. Die Verschiebung der Fraktion $\langle \lambda_1 \rangle$ wird von keinem der beiden Tests bei $\alpha = 0.01$ als signifikant bewertet. Die größte Änderung ist in HeLa-Zellen bei dem Lebenszeitmittelwert $\langle \tau_2 \rangle$ zu sehen. Die Verschiebungen von $\langle \tau_1 \rangle$ unter Menadion-Behandlung sind sowohl bei HeLa- als auch bei U2OS-Zellen einheitlich negativ. Die zeitliche Distanz $\langle \tau_2 - \tau_1 \rangle$ der paarweisen Lebenszeiten nimmt sowohl bei HeLa- als auch bei U2OS-Zellen signifikant zu. Diese Änderung wird durch den Kolmogorow-Smirnow- und den Wilcoxon-Ranksum-Test bestätigt. Bei U2OS-Zellen ist die Zunahme der paarweisen Lebenszeitdifferenzen nach der Menadion-Behandlung deutlich geringer als bei HeLa-Zellen. Desweiteren fällt auf, dass die Fehler s_E der größeren Lebenszeit $\langle \tau_2 \rangle$ systematisch größer sind als die der kleineren Lebenszeit $\langle \tau_1 \rangle$ [Kapitel 3.2.5]. Dieser Effekt kommt durch die dichtere Darstellung großer Lebenszeiten im Phasorplot zustande.

Räumliche Verteilung der Lebenszeitfraktionen

Mit Hilfe der Phasorauswertung ist es auch beim Redox-Sensor CellRox-DeepRed möglich, den *Phasor-Slicing*-Algorithmus zur Zellkompartimentseparation [Kapitel 4.3.1] anzuwenden, um räumliche Fraktionsheterogenitäten innerhalb des Zytoplasmas aufzudecken. Hierfür wird bei beiden Zelltypen im Phasor-Histogramm entlang der linearen Regressionsgerade das Maximum p_{\max} bei der häufigsten Fraktion $\lambda_{1,\max}$ gesucht und an dieser Stelle eine Lotgerade zur Regressionsgeraden erstellt. Alle Phasorpunkte, die tendenziell zu geringeren oder größeren Fraktionsbeiträgen gehören, werden unterschiedlich gefärbt in die Bildebene übertragen, um Heterogenitäten zu finden, wie sie im Fall von *Phasor-Slicing* vorhanden waren und dort die Kompartimentseparation möglich machten. Mit Hilfe dieser Separationsmethode konnte allerdings keine räumliche Abhängigkeit der verschiedenen Fraktionen gefunden werden. Tendenziell kleinere Lebenszeitfraktionen $\lambda < \lambda_{1,\max}$ und tendenziell größere $\lambda > \lambda_{1,\max}$ sind homogen über das Zytoplasma verteilt.

5.4.3. Zellensemble-Phasor-Analyse

Wesentliche Ergebnisse

Die Auswertung über Zellensemble-Phasor ergibt, dass die CellRox-DeepRed-Lebenszeiten in HeLa-Zellen eine signifikante Erhöhung nach der Menadion-Behandlung zeigen. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der doppel-exponentiellen Kurvenanpassung. Wesentlich geringere, negative Änderungen der Lebenszeiten sind in U2OS-Zellen über diese Methode nachweisbar.

Um das SNR der Phasor-Auswertung zu erhöhen und eine bessere Übersicht über die Veränderung der Lebenszeitpopulationen zu erhalten, wird je ein Histogramm pro Zelle erstellt und nach Kapitel 3.2.3 transformiert. Auf diese Weise erhält man je gemessener Zelle einen Eintrag im Phasorraum. Die Zahl der Phasorpunkte je Zustand und Zelltyp ist damit identisch zur Größe des jeweiligen Zellensembles [Tab. 5.1]. Bei dieser Auswertung wird auf die Angabe einer Fraktion verzichtet, da sich nur sehr wenige Phasorpunkte der Zellen direkt auf der Regressionsgerade befinden. Es werden ebenfalls $N_h = 512$ Einträge nach dem Histogrammmaximum bei $\tau_{A,\max}$ verwendet, um die Resultate mit der gewöhnlichen Phasor-Auswertung vergleichen zu können. Verwendet man $N_h = 1024$ Einträge erhält man jedoch dasselbe Resultat. Wegen dem deutlich besseren SNR kann der Glättungsfaktor auf $N_s = 1$ gesetzt und damit ausgeschaltet werden. Diese Auswertemethode verändert somit die Ankunftszeithistogramme im Gegensatz zur die Phasor-Analyse in Kapitel 5.4.2 nicht.

Die Phasor-Verteilungen der Lebenszeiten $\tau_{1,2}$, sind für HeLa-Zellen in Abb. 5.9 und für U2OS-Zellen in Abb. 5.10 zu sehen. Die Mittelwerte und Mittelwertsverschiebungen sind in Tab. 5.7 zusammengefasst und bilden die Grundlage für die Beschreibung der Auswertegrößen und deren Verhalten unter Menadion-Behandlung.

Während sich bei den U2OS-Zellen die Verteilung der Zellen, ob behandelt oder unbehandelt, im selben Bereich der Phasor-Darstellung befindet [Abb. 5.10], ist dies bei HeLa-Zellen [Abb. 5.9] nicht der Fall. Tatsächlich ist die Phasor-Darstellung der unbehandelten HeLa-Zellen der Darstellung der U2OS-Zellen insofern ähnlich, dass sich dort alle Zellen entlang einer Linie anordnen. Menadion-behandelte HeLa-Zellen deuten jedoch das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Populationen, Pop. 1 und Pop. 2 im Phasorhistogramm an. Die zusätzliche Population (Pop. 1) zeigt, dass sich die CellRox-DeepRed Lebenszeiten tatsächlich ändern und nicht nur, wie im Falle von DASPMI, die Lebenszeitfraktionen [Kapitel 4].

Fasst man die beiden Populationen Pop. 1 und Pop. 2 zusammen und betrachtet die Phasorwolke Menadion-behandelter HeLa-Zellen als ganzes, könnte diese auch so interpretiert werden, dass eine dritte Lebenszeiten τ_3 vorhanden ist, die durch die doppel-

ponentielle Kurvenanpassung nach Kapitel 3.2.2 herausgefiltert wurde, und aufgrund des niedrigen SNR der Phasor-Analyse nicht ins Gewicht fiel.

Betrachtet man die Änderung der CellRox-DeepRed-Lebenszeiten $\tau_{1,2}$ durch die Menadion-Behandlung in HeLa-Zellen über die Zellensemble-Phasor-Auswertung in Abb. 5.9 und Tab. 5.7, erkennt man, dass beide Änderungen, sowohl $\Delta\tau_1$ als auch $\Delta\tau_2$, positiv sind. Das heißt, in HeLa-Zellen bewirkt die Menadion-Behandlung eine Lebenszeiterhöhung von CellRox-DeepRed. Dieses Ergebnis stimmt qualitativ mit dem Resultat der doppelexponentiellen Kurvenanpassung überein. Die Änderungen der CellRox-DeepRed-Lebenszeiten durch die Menadion-Behandlung in U2OS-Zellen über die Zellensemble-Phasor-Auswertung in Abb. 5.10 und Tab. 5.7 sind dagegen wesentlich geringer und negativ. Die Untersuchung der statistischen Signifikanz der Lebenszeitverschiebungen bei dieser Auswertemethode ist nicht möglich, da das Zellensemble die Phasorverteilung definiert.

E-PHASOR	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]
HeLa U	1.10	1.53
HeLa T	1.23	1.78
Δ (T-U)	0.13	0.25
U2OS U	1.18	1.62
U2OS T	1.11	1.60
Δ (T-U)	-0.07	-0.02

Tabelle 5.7.: Lebenszeiten von CellRox-DeepRed in der Zellensemble-Phasor Betrachtung. Gezeigt werden die Zellensemble-Phasor (E-PHASOR) Lebenszeiten τ_1 und τ_2 von CellRox-DeepRed in HeLa- und U2OS-Zellen. Die Tabelle fasst die Lebenszeiten τ_1 und τ_2 von Abb. 5.10 und Abb. 5.9 zusammen. **Rot** sind die Differenzen zwischen behandeltem und unbehandeltem Zellzustand Δ (**T-U**) hervorgehoben, die sich aus den Messungen mit und ohne Menadion-Behandlung ergeben. In U2OS-Zellen erhält man Lebenszeitverringerungen (*quenching*): $\Delta\tau_{1,(T-U)} = -0.07$ ns und $\Delta\tau_{2,(T-U)} = -0.02$ ns, und in HeLa-Zellen Lebenszeiterhöhungen: $\Delta\tau_{1,(T-U)} = 0.13$ ns und $\Delta\tau_{2,(T-U)} = 0.25$ ns.

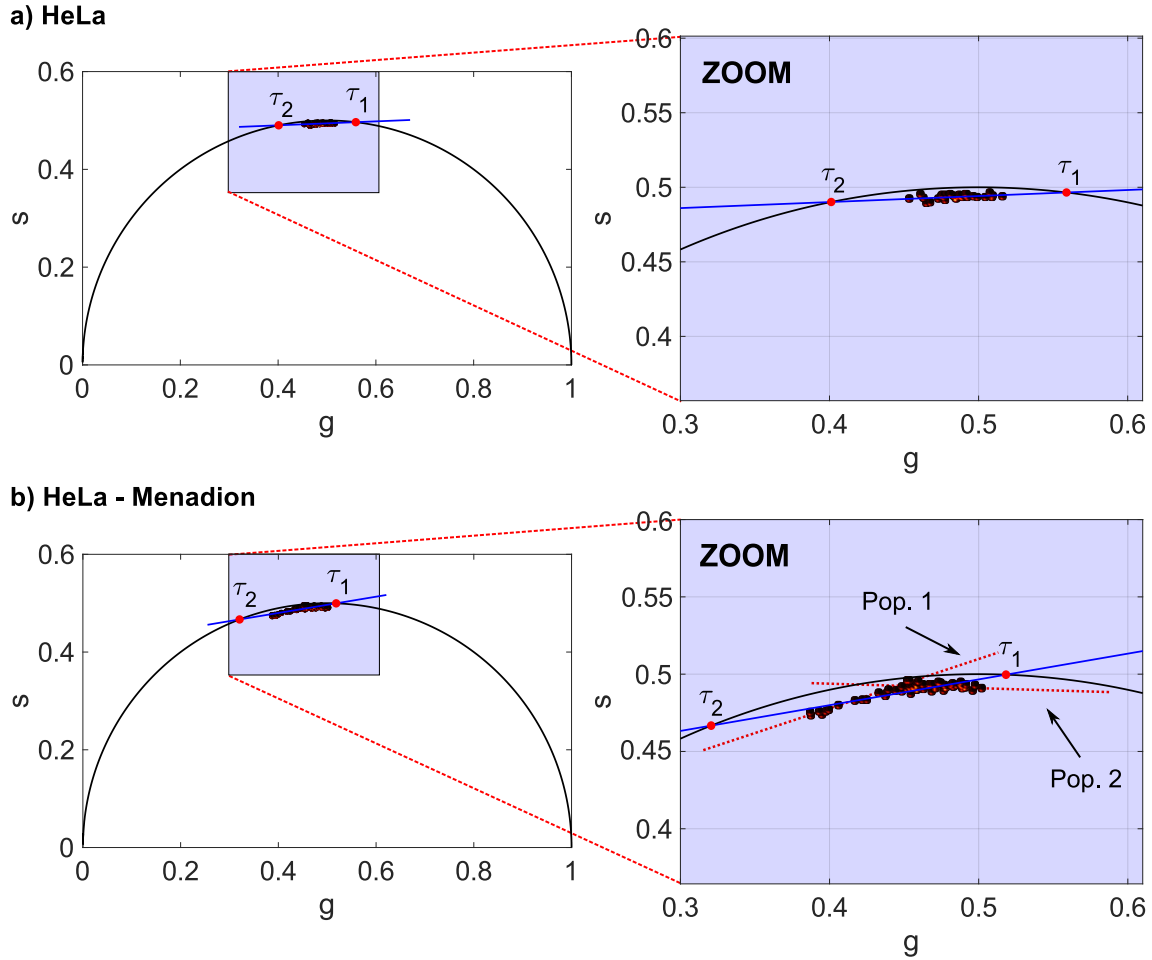
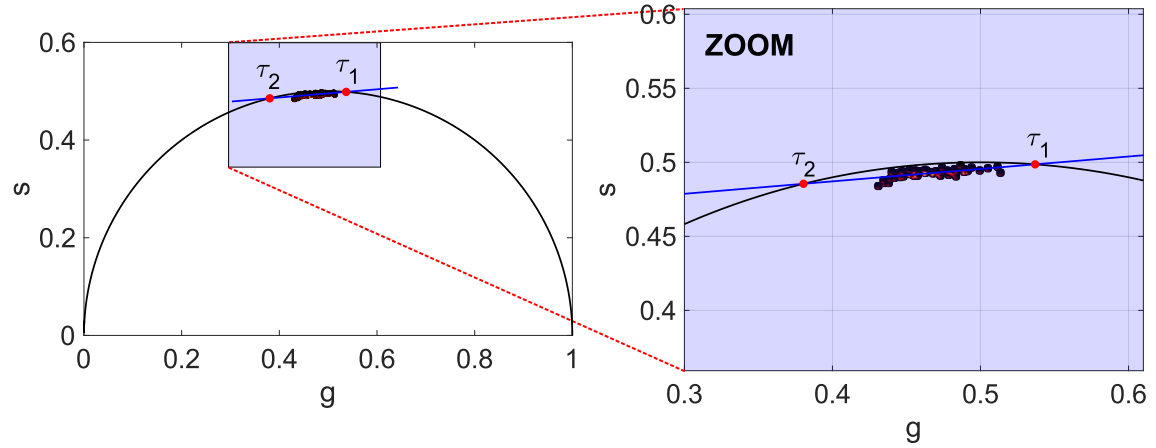


Abbildung 5.9.: Zellenensemble-Phasor Darstellung der CellRox-DeepRed Lebenszeiten in HeLa-Zellen. Die Abbildung zeigt die Zellenensemble-Phasor Darstellung der Ankunftszeithistogramme aller gemessener HeLa-Zellen. Je Zelle wird ein Ankunftszeithistogramm erstellt und transformiert. Die Anzahl der Phasorpunkte in der Phasordarstellung entspricht damit der Zellenensemblegröße in Tab. 5.1 für HeLa-Zellen. $N_{\text{cell,U}} = 31$, $N_{\text{cell,T}} = 67$, Index U: unbehandelte HeLa-Zellen, Index T: Menadion-behandelte HeLa-Zellen. Die Regressionsgerade minimiert die Abweichungen zu allen Phasorpunkten und verbindet τ_1 und τ_2 , mit $\tau_1 < \tau_2$. **a)** Unbehandelte HeLa-Zellen, **b)** HeLa-Zellen nach der Menadion-Behandlung. **Rechts** ist jeweils der vergrößerte relevante Ausschnitt der Phasordarstellung (**ZOOM**) gezeigt. Man erkennt eine Erhöhung der Lebenszeiten τ_1 und τ_2 nach der Menadion-Behandlung, bezogen auf den physiologischen Zustand. Dabei fällt auf, dass in der Phasordarstellung der Menadion-behandelten Zellen die Verteilung der unbehandelten Zellen enthalten zu sein scheint, unter Menadion-Behandlung jedoch eine zusätzliche Fraktion bei größeren Lebenszeiten vorhanden ist. Eine mögliche Trennung beider Populationen in **Pop. 1** und **Pop. 2** ist durch die roten gestrichelten Linien gezeigt. Die Population **Pop. 1** wird durch $N_{\text{cell}} \approx 20$ Zellen gebildet. Wertet man die volle Phasorwolke unbehandelter und Menadion-behandelter HeLa-Zellen mit Hilfe der Regressionsgerade aus, erhält man die Lebenszeiten $\tau_{1,\text{U}} = 1.10$ ns und $\tau_{2,\text{U}} = 1.53$ ns für unbehandelte HeLa-Zellen und $\tau_{1,\text{T}} = 1.23$ ns und $\tau_{2,\text{T}} = 1.78$ ns für Menadion-behandelte HeLa-Zellen.

a) U2OS



b) U2OS - Menadion

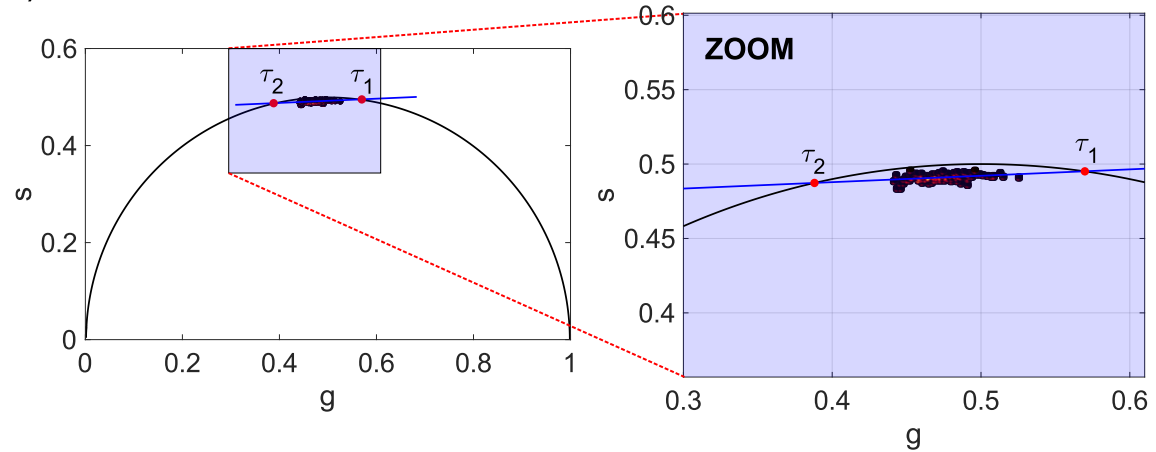


Abbildung 5.10.: Zellensemble-Phasor Darstellung der CellRox-DeepRed Lebenszeiten in U2OS-Zellen. Die Abbildung zeigt die Zellensemble-Phasor Darstellung der Ankunftszeithistogramme aller U2OS-Zellen. Je Zelle wird ein Ankunftszeithistogramm erstellt und transformiert. Die Anzahl der Phasorpunkte in der Phasordarstellung entspricht damit der Zellensemblegröße in Tab. 5.1 für U2OS-Zellen. $N_{\text{cell,U}} = 76$, $N_{\text{cell,T}} = 128$, Index U: unbehandelte HeLa-Zellen, Index T: Menadion-behandelte HeLa-Zellen. Die Regressionsgerade minimiert die Abweichungen zu allen Phasorpunkten und verbindet τ_1 und τ_2 , mit $\tau_1 < \tau_2$. **a)** Unbehandelte U2OS-Zellen, **b)** U2OS-Zellen nach der Menadion-Behandlung. **Rechts** ist jeweils der vergrößerte, relevante Ausschnitt der Phasordarstellung (**ZOOM**) gezeigt. Man erkennt keine signifikante Änderung der Lebenszeiten τ_1 und τ_2 nach der Menadion-Behandlung. Die Verteilungen der Phasorpunkte im Phasorraum zeigen im Vergleich von unbehandelten U2OS-Zellen und Menadion-behandelten U2OS-Zellen qualitativ dasselbe Verhalten. Man erhält die Lebenszeiten $\tau_{1,\text{U}} = 1.18 \text{ ns}$ und $\tau_{2,\text{U}} = 1.62 \text{ ns}$ für unbehandelte U2OS-Zellen. Für Menadion-behandelte U2OS-Zellen erhält man $\tau_{1,\text{T}} = 1.11 \text{ ns}$ und $\tau_{2,\text{T}} = 1.60 \text{ ns}$.

5.5. Diskussion

Kernaussagen

CellRox-DeepRed reagiert in HeLa-Zellen spezifisch auf die oxidative Stresszunahme mit einer Erhöhung sowohl der Intensität als auch der Lebenszeit. In U2OS-Zellen ist zwar die Lebenszeitveränderung nicht signifikant, die Intensitätserhöhung aber trotzdem messbar. Für die quantitative Verknüpfung von Fluoreszenzlebenszeit und oxidativem Stress ist der Sensor nicht geeignet. Die Fluoreszenzintensität kann als Eichgröße in zukünftigen Experimenten verwendet werden.

In diesem Kapitel werden die Resultate aller Experimente mit CellRox-DeepRed in HeLa- und U2OS-Zellen zusammengefasst und diskutiert. Als Überblick und Diskussionsgrundlage dient hierfür die Zusammenfassung der signifikanten Lebenszeitunterschiede, Fraktionen und Lebenszeitdifferenzen in Tab. 5.8, die durch die Menadion-Behandlung nachweisbar sind. Die Signifikanztests Kolmogorow-Smirnow und Wilcoxon-Ranksum werden verwendet, um eine Entscheidung bezüglich der Lebenszeitänderungen zu erhalten. Als Signifikanzniveau wird stets $\alpha = 0.01$ verwendet. Schwarz markierte (K,W) bedeuten dort keine signifikanten Unterschiede, rot markierte (K,W) signifikante Unterschiede der Lebenszeitmittelwerte bzw. Mediane. Im Rahmen dieser Diskussion wird deutlich, warum die Klassifizierung und Bewertung eines größtenteils unbekannten Farbstoffes in seiner Verwendung als Redox-Sensor schwierig ist und gründlicher Untersuchung bedarf.

Betrachtet man den Auflösungsfehler des TCSPC-Systems s_{sharp} im Vergleich zu den Mittelwertsverschiebungen fällt auf, dass sämtliche signifikante Änderungen gleichzeitig größer als der Auflösungsfehler sind. Ebenso werden von den Signifikanztests keine Änderungen die kleiner als der Auflösungsfehler sind als wesentlich bewertet.

5.5.1. Zuverlässigkeit der verwendeten Auswertemethoden

Vergleicht man die Auswertemethoden untereinander, kann festgehalten werden, dass die einfache FLIM-Phasor-Methode zur Extraktion der Lebenszeiten durch die lokalen Helligkeitsunterschiede zellulärer Proben sehr fehleranfällig ist. Dies liegt auch daran, dass im Mikroskop-Messmodus keine Möglichkeit besteht, eine Mindestphotonenzahl, äquivalent zu einem minimalen SNR, einzustellen. Lediglich die maximale Photonenzahl je Pixel kann gewählt werden. Dadurch kann es vorkommen, dass wenige, sehr helle Regionen, wie z.B. einzelne Mitochondrien, die Statistik der gesamten Zelle bestimmen. Wählt man nur diejenigen Pixel für die Auswertung, die eine Mindesthelligkeit über einen Schwellenwert besitzen, schwankt die Anzahl der Phasorpunkte von Auswertung zu Auswertung. Im Falle des Sensors CellRox-DeepRed hätte die Messzeit auf mindestens $T_{\text{mess}} = 30$ min je Zelle erhöht werden müssen, um die Heterogenität der Helligkeit

soweit auszugleichen, dass die Phasor-Auswertung der FLIM-Daten zuverlässige Ergebnisse liefert. Aus persönlicher Erfahrung wird diese Methode für quantitative Auswertungen erst ab einer Photonenzahl $N_{\text{phot}} \approx 2000$ für sinnvoll erachtet. Für qualitative Untersuchungen reichen bereits Photonenzahlen ab $N_{\text{phot}} \approx 500$.

SIG. TESTS	HeLa				U2OS			
	τ_1	λ	τ_2	$\Delta\tau$	τ_1	λ	τ_2	$\Delta\tau$
DE-Fit	K W	K W	K W	K W	K W	K W	K W	K W
SHIFT	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
Phasor	K W	K W	K W	K W	K W	K W	K W	K W
SHIFT	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
E-PH	-	-	-	-	-	-	-	-
SHIFT	(+)	-	(+)	-	(-)	-	(-)	-

Tabelle 5.8.: Signifikante Änderungen der CellRox-DeepRed Parameterverteilungen - Alle Auswertemethoden. Die Tabelle fasst die Resultate der Verteilungsprüfungen der τ_1 , τ_2 , $\tau_2 - \tau_1$ und λ in HeLa- und U2OS-Zellen mittels Signifikanztests bei $\alpha = 0.01$ zusammen. Bei der doppel-exponentiellen Kurvenanpassung gilt $\lambda = \lambda_1$, bei der Phasorauswertung gilt $\lambda = \lambda_{1,\text{max}}$. In allen Fällen wird geprüft, ob sich die Verteilung der τ_i , $\Delta\tau = \tau_2 - \tau_1$ und λ , gemessen in unbehandelten Zellen von den Verteilungen in Menadion-behandelten Zellen bei $\alpha = 0.01$ signifikant unterscheiden. **K** steht dabei für Kolmogorow-Smirnow-Test und **W** für Wilcoxon-Ranksum-Test. Der Kolmogorow-Smirnow-Test prüft den Unterschied der Mittelwerte, der Wilcoxon-Ranksum-Test den Unterschied der Mediane. Die Richtung der Mittelwertsverschiebung ist in der Zeile **SHIFT** gezeigt. (+): Verschiebung unter Menadion-Behandlung zu größeren Lebenszeiten, (-): Verschiebung unter Menadion-Behandlung zu kleineren Lebenszeiten. **Schwarz** zeigt dabei, dass die Verteilungen von unbehandelten und behandelten Zellen als nicht signifikant unterschiedlich bezüglich der CellRox-DeepRed Lebenszeit erachtet wurden, **rot**, dass signifikante Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen bezüglich ihrer Verteilungen gefunden wurden. Auswertung der Ankunftszeithistogramme über **DE-Fit**: doppel-exponentielle Kurvenanpassung, **Phasor**: Auswertung über Phasor, **E-PH**: Auswertung über Zellensemble-Phasor. In fast allen Fällen bewerteten der Kolmogorow-Smirnow- und der Wilcoxon-Ranksum-Test die Verteilungsunterschiede einheitlich. Im Fall der Phasorauswertung in U2OS-Zellen ist die Verschiebung von τ_2 nach dem Kolmogorow-Smirnow-Test insignifikant, nach dem Wilcoxon-Ranksum-Test signifikant. Die Ergebnisse der Zellensemble-Phasor-Auswertung lassen sich nicht über statistische Tests prüfen, da dort das Zellensemble die Grenzlebenszeiten definiert.

Bei der doppel-exponentiellen Kurvenanpassung werden alle pixelweisen Histogramme zu einem Ankunftszeithistogramm zusammengefasst, das in allen Fällen ein ausgezeichnetes SNR hat. Die Problematik dieser Methode sind die Modellannahme an sich, die Zahl der Fitparameter und der Einfluss der IRF bei kurzen Zeiten. Diese Einflüsse können jedoch mit dem vorgestellten Algorithmus verringert werden, sodass unter der Annahme, dass die Verteilung einen doppel-exponentiellen Charakter hat, der Bereich ausgewählt wird, der am besten der Modellannahme gehorcht. Diese Auswertemethode liefert vergleichbare absolute Lebenszeiten zur Phasor-Methode bei einer maximalen Variation des Startwertes von $\Delta\tau_{\text{A,id}} = 0.45$ ns. Führt man die Auswertung mit festem Startwert $\tau_{\text{A,id}}$ durch, erhält man für CellRox-DeepRed etwa halb so große Lebenszeiten

bei doppelter Streuung der Fitparameter. Dies könnte daran liegen, dass der verwendete Fit-Algorithmus *quenching*-Prozesse herausfiltert, die mit einer dritten oder vierten Lebenszeiten τ_3 , τ_4 verknüpft wären.

Liegt ein Zellensemble vieler Messungen unter gleich gewählten Bedingungen vor, lassen sich die Stärken beider Methoden, nämlich die Modellfreiheit der Phasor-Methode mit dem ausgezeichneten SNR der Ankunftszeithistogramme einer gesamten Zelle verknüpfen. Mit Hilfe dieser Methode erhält man in HeLa-Zellen qualitativ dieselben Resultate wie über die doppel-exponentielle Kurvenanpassung. Darüber hinaus ermöglicht die Zellensemble-Phasor-Methode eine Übersicht über eine ganze Messreihe mit allen wesentlichen Informationen, den Lebenszeiten, Fraktionen und Populationsanordnungen in einem Graphen. Diese Methode ist ohne Einschränkungen zu empfehlen.

5.5.2. Diskussion der Resultate

Lebende Zellen setzen im Rahmen der Zellatmung, ob über den Citratzyklus oder die glykolytische Energiegewinnung, ROS frei. Sie haben die Fähigkeit beispielsweise durch die Bildung von Glutathion (GSH) über die Glutathion-Peroxidase ein starkes Antioxidant zu synthetisieren, das der unkontrollierten Zunahme freier Radikale im Zytoplasma^[142] entgegenwirkt^[128] und während der Messzeit aktiv ist. Obwohl während der Experimente kein wesentlicher Intensitätsrückgang von CellRox-DeepRed beobachtet wurde, kann ohne weitere Untersuchung nicht ausgeschlossen werden, dass der Sensor nach der Aktivierung durch ROS, durch zelluläre Antioxidantien deaktiviert werden kann. Weiterhin ist unbekannt, wie hoch die spezifische Aktivierungseffizienz von CellRox-DeepRed ist.

Der wesentliche Wirkmechanismus von Menadion beruht auf der Störung der Glutathion-Synthese^[143]. Dies führt bei hohen Menadion-Dosierungen zu einer Anhäufung zytotoxisch wirksamer Mengen freier Sauerstoffradikale. Diese zytotoxische Wirkung von Menadion konnte belegt werden durch Menadion-Dosen über 100 μM , die bei beiden Zelllinien zum Zelltod führten. Darüber hinaus erzeugen überschüssige ROS Unterschiede in der Permeabilität der mitochondrialen Membran^[144] und führen zum Abbau intrazellulärer Antioxidantien, was wiederum die Apoptose einleitet^{[145] [146]}.

Die herstellerseitig angegebene Intensitätserhöhung von CellRox-DeepRed durch die oxidative Stresszunahme in lebenden Zellen ist sowohl in HeLa- als auch in U2OS-Zellen nachweisbar und liegt zwischen $\langle I_{\text{av}} \rangle = 15 - 28 \%$. Die Änderungen sind offensichtlich signifikant und wurden deshalb nicht über statistische Tests untersucht.

Die Prüfung der Wirkung von Menadion auf HeLa- und U2OS-Zellen zeigt im Rahmen der Lebenszeitauswertungen kein über alle Untersuchungsverfahren konsistentes Bild. Die doppel-exponentielle Kurvenanpassung zeigt bei allen drei geprüften Größen: $\tau_{1,2}$ und λ_1 deutliche Unterschiede zwischen HeLa- und U2OS-Zellen auf. Diese Unterschiede zwischen den oxidativen Stresszuständen lassen sich in HeLa-Zellen mit Hilfe von

Signifikanztests bestätigen, während bei U2OS-Zellen die Änderungen sehr gering und statistisch nicht signifikant sind.

Bestätigt wird das Ergebnis der doppel-exponentiellen Kurvenanpassung letztlich durch die Zellensemble-Phasor Auswertung, bei der deutlich zu sehen ist, dass bei HeLa-Zellen durch die oxidative Stressbehandlung eine neue Population, „Pop. 1“, von Zuständen und Lebenszeiten erzeugt wird, während bei U2OS-Zellen behandlungsübergreifend die Populationsverteilungen annähernd gleich bleiben. Während bei HeLa-Zellen die Population 2 in Abb. 5.9 b), dem unbehandelten Zustand in Abb. 5.9 a) zugeordnet werden kann, steht die Population 1 für sich. Für diese Anordnung der Phasorpunkte Menadion-behandelter HeLa-Zellen gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten. Entweder kommt die Population 1 durch Messausreißer oder durch extreme zelluläre Stresszustände zustande. Gegen die Theorie als Messausreißer spricht, dass die Population 1 durch $N_{\text{cell}} \approx 20$ HeLa-Zellen, etwa einem Drittel des Ensembles, gestützt wird. Nimmt man also an, dass „Pop. 1“ nicht durch Messausreißer zustandekommt, gibt es zwei Möglichkeiten, die Anordnung der Phasorpunkte zu erklären. Diese Möglichkeiten werden im Folgenden qualitativ diskutiert.

Entweder hat CellRox-DeepRed drei Lebenszeiten τ_1, τ_2, τ_3 oder einen molekularen Rotorcharakter. Drei Lebenszeiten zeigen sich im Phasorraum durch eine dreieckige Anordnung der Phasorpunkte, deren Ecken auf dem Universalhalbkreis liegen. Diese Form wird angedeutet, erfüllt aber nicht alle Kriterien für eine eindeutige dreifach-exponentielle Zerfallscharakteristik der Ankunftszeithistogramme. Ordnet man die Lebenszeiten gemäß Gl. (5.5) den Ecken des Phasorpolygons in Abb. 5.9 b) zu, zeigt sich, dass auf der Verbindungslinie zwischen τ_2 und τ_3 keine Phasorpunkte zu finden sind.

$$\tau_1 < \tau_2 < \tau_3 \quad (5.5)$$

Das bedeutet, dass extreme Lebenszeitunterschiede $\tau_3 - \tau_1$ nicht vorkommen. Durch die doppel-exponentielle Kurvenanpassung erhielt man ebenfalls das Ergebnis, dass die Lebenszeitunterschiede $\tau_2 - \tau_1$, mit $\tau_2 > \tau_1$, ähnlich bleiben. Da der Fit-Algorithmus [Kapitel 3.2.2] aber immer die zwei größten Lebenszeiten des Ankunftszeithistogrammes herausfiltert, können die angepassten Lebenszeiten entweder zur Population 1: $\tau_{1,2}$ oder zur Population 2: $\tau_{2,3}$ gehören. Während die Information über die Populationszugehörigkeit über die doppel-exponentielle Kurvenanalyse nicht ohne weiteres zugänglich ist, erhält man über Phasor die Sicherheit, dass auch wenn CellRox-DeepRed drei Lebenszeiten zeigt, Kombinationen der Lebenszeiten τ_3 und τ_1 nicht vorkommen. Das Vorhandensein dreier Lebenszeiten kann somit weder ausgeschlossen noch bestätigt werden, hierfür wäre ein deutlich größeres Zellensemble je Zelltyp und Behandlungszustand nötig.

Ein angenommener molekularer Rotorcharakter andererseits würde die Anordnung der Phasorpunkte entlang je einer Linie im Phasorraum erklären. Für diese Theorie müsste die Beweglichkeit eventueller Rotationsachsen von CellRox-DeepRed je nach Aktivierungszustand unterschiedlich sein. Nach dieser Überlegung ordnen sich die Populatio-

nen Pop. 1 und Pop. 2 entlang zweier zueinander gekippter Regressionsgeraden an. Die Verteilung der Zellen je Population entlang der Regressionsgerade gibt dann das Viskositätsspektrum der Populationen wieder. Für den molekularen Rotorcharakter spricht das Argument, dass Kombinationen aus τ_2 und τ_3 nicht vorkommen. Um den Rotorcharakter nachzuweisen müssten weitere Experimente in unterschiedlich viskosen Medien *in vitro* durchgeführt werden.

Die Ankunftszeit-Ankunftszeit-Korrelationsuntersuchung an CellRox-DeepRed lieferte keine statistische Abhängigkeit einer bestimmten und darauffolgender Photonenankunftszeiten. Dies muss nicht zwingend für andere Fluorophore gelten, dieselbe Untersuchung eines Kollegen, Christopher Greve, am EKAR-Sensor^[147] brachte jedoch dasselbe Resultat hervor. Insbesondere im Zusammenhang mit der räumlichen Auflösbarkeit von Fluoreszenzlöschungsprozessen wäre die Aufdeckung eines solchen Effektes interessant gewesen. Die Messungen schließen diesen Effekt nicht grundsätzlich aus. Lediglich auf den untersuchten Zeitskalen, begrenzt auf ein konfokales Volumen, ist kein Zusammenhang sichtbar.

Eine weitere Untersuchung befasste sich mit der räumlichen Verteilung von größeren oder kleineren Fraktionsbeiträgen als der häufigsten Fraktion $\lambda_{1,\max}$ mit Hilfe der Phasordarstellung an einzelnen HeLa- und U2OS-Zellen. Eine ähnliche Untersuchung führte in Kapitel 4 zu der Möglichkeit, zelluläre Kompartimente zu separieren. Im Falle von CellRox-DeepRed zeigt sich jedoch ein homogenes Bild der räumlichen Verteilung von $\lambda_1 < \lambda_{1,\max}$ und $\lambda_1 > \lambda_{1,\max}$. Da für die Auswertung der gesamte zytoplasmische Bereich, der über eine Mindestintensität verfügt, gewählt wurde, und dieser durchaus heterogene, mitochondriale Strukturen erkennen lässt, wäre die Wiedergabe dieser Strukturen möglich gewesen. Ein Grund für die räumlich homogene Verteilung der Fraktionen könnte der Warburg-Effekt^{[148][149]} sein, nachdem in Krebszellen im gesamten zytoplasmischen Bereich die glykolytische Energiegewinnung gegenüber der ATP-Synthese über die Atmungskette bevorzugt wird und mit der Energiegewinnung durch die Mitochondrien konkurriert. Die verwendeten Nährmedien enthalten hohe Glukosekonzentrationen, was diesem Mechanismus zusätzlichen Raum bietet und eine homogene Freisetzung glykolytischer ROS begünstigt.

Auch wenn ein durch CellRox-DeepRed nachweisbarer Effekt in U2OS-Zellen durch die Menadion-Behandlung sichtbar war, zeigten HeLa-Zellen den Einfluss oxidativen Stresses wesentlich stärker. Daher stellt sich die Frage, was die Gemeinsamkeiten und Unterschiede beider Zelltypen sind, welche die unterschiedliche Reaktion auf oxidativen Stress erklären und verknüpfen könnten. Zum Teil geht der erhöhte oxidative Stress in den behandelten Zellen auf die Hemmung der Glutathion-Synthese durch Menadion zurück. Dies ist ein Effekt, der vermutlich in beiden Zelllinien gleichermaßen stark ausgeprägt ist. HeLa-Zellen sind allerdings HPV (*human papilloma virus*)-positive Zellen^{[150][151]}, während die U2OS-Zelllinie hiervon nicht betroffen ist. Eine mögliche Ursache für die durch CellRox-DeepRed in HeLa-Zellen verstärkt wiedergegebene Intensitätserhöhung wie auch Lebenszeitverschiebung könnte an der bereits oxidativen Stress

verursachenden Infektion HPV an sich liegen^[152]. Außerdem könnte die Fähigkeit der Zellen, zusätzlichen oxidativen Stress zu kompensieren durch HPV reduziert sein. Dieser Zusammenhang ist Gegenstand der Forschung^{[153][154]} und noch nicht vollständig verstanden.

Der Redox-Zustand von Zellen unterliegt einer Vielzahl regulatorischer zellulärer Eingriffe, deren Kontrolle durch den Experimentator bestenfalls schwer, realistisch betrachtet jedoch aufgrund der Komplexität nicht möglich ist. Fügt man Zellen oxidativen Stress zu, beginnt ein komplizierter Mechanismus zur Gegenregulation, dessen Intensität und Art vom aktuellen Zellzyklusabschnitt und der gesamten Beschaffenheit der individuellen Zelle abhängt. Darüber hinaus muss beachtet werden, dass immer ein nichtstationärer Zustand der Zelle gemessen wird, der einige Zeit später ein anderes Resultat zur Folge haben könnte.

Aber nicht allen Arten externen Stresses begegnet die Zelle derart vehement, sodass im Falle von hyperosmotischem Stress tatsächlich stationäre Zustände innerhalb kurzer Zeit erreichbar und messbar sind. Das nächste Kapitel befasst sich mit der Auswirkung von hyperosmotischem Stress auf humane Zervixkarzinomzellen und mit der Messbarkeit seiner Folgen auf die intrazellulären Fluide, Zytoplasma und Nukleoplasma, mit Hilfe des FRET-Sensors fCrH2.

Kompartimentspezifische intrazelluläre Gedrängtheit

Die Osmose als Mechanismus zum Ausgleich von intra- und extrazellulärer Molekülkonzentrationen wurde in der Einleitung, auch mit Bezug zur Thermodynamik, im Rahmen des chemischen Potentialausgleichs, bereits vorgestellt. Im physiologischen, isotonischen Zustand einer Zelle ist der Austausch von Wasser mit seiner Umgebung im isotonischen Gleichgewicht^{[155] [156]}, das heißt die Wassermenge, die durch die selektiv permeable Zellmembran in die Zelle strömt, ist im Gleichgewicht mit der herausströmenden Menge. Der Prozess der Dehydrierung kann dieses Gleichgewicht stören und die Form der Zellen beeinflussen. Untersuchungen an U2OS-Zellen durch Sukenik et al.^[157] zeigen, dass unter dem Einfluss hyperosmotischen Stresses eine Abflachung der Zellen auftritt, während die Kontaktfläche zum Substrat annähernd gleich bleibt.

Bezogen auf den menschlichen Körper sind drei Arten der Dehydrierung bekannt. Die isotonische, die sowohl mit dem Verlust von Wasser als auch von Salzen gleichermaßen einhergeht, die hypertonische, bei der im Verhältnis der Wasserverlust größer als der Salzverlust ist und die hypotonische, bei der der Salzverlust den Wasserverlust überwiegt. Letztere Dehydrierung wird unter anderem paradoxerweise durch übermäßiges Trinken nichtisotonischer Flüssigkeiten, wie zum Beispiel destilliertem Wasser hervorgerufen. Die isotonische Dehydrierung tritt beim Menschen im pathologischen Fall auch bei Magen-Darm-Grippen auf, die zu salzhaltigem Flüssigkeitsverlust durch Erbrechen und Durchfall führen.

Für die Forschung interessant ist insbesondere die hypertonische Dehydrierung, da diese auch durch das Trinken von Salzwasser, z.B. Meerwasser entsteht, da hierbei ebenfalls das Salz-zu Wasser-Verhältnis steigt. In diesem Fall wird Wasser aus dem Zellinneren in die extrazelluläre Matrix transportiert, um dort die Salzkonzentration auszugleichen, wodurch das Zellvolumen schrumpft. Die hypertonische Dehydrierung, ob durch Wasserverlust oder Trinken von Meerwasser, kann beim Menschen im Extremfall zu Ödemen führen^[158]. Ein bekanntes Beispiel für ein Ödem ist der Wasserkopf (Hydrocephalus)^[159]. Durch den pathophysiologischen Kontext ist also die Messung intrazellulärer Fluide auf ihre Veränderung durch hyperosmotischen Stress interessant.

Die Volumenreduktion der Zelle führt dazu, dass die Gedrängtheit zellulärer Fluide zunimmt. Diese Größe ist zwar nicht genau definiert, auch aus dem Grund, dass sie skalenvariant ist, steht aber in enger Verbindung zur anomalen Diffusion (*anomalous diffusion*). Generell nimmt die Anomalie der Diffusion zu, sobald das *Crowding* zunimmt^[160].

Eine wichtige Entdeckung bezüglich der anomalen Diffusion war, dass die Reaktionswahrscheinlichkeit bzw. Interaktionswahrscheinlichkeit von Proteinen unter anomaler Diffusion gegenüber normaler Diffusion zunimmt^{[161][162]}. Damit steht das *Crowding* in wichtigem Bezug zur Homöostase lebender Zellen^[163]. Eine industrielle Anwendung findet die Erhöhung der Gedrängtheit bei PCR (*polymerase chain reaction*)^[164], um die Polymerasegeschwindigkeit zu steigern.

Boersma et al.^[71] entwickelte im Jahr 2015 einen FRET-Sensor, mit dessen Hilfe makromolekulare Gedrängtheit in Zellen nachgewiesen werden kann. Die Variante fCrH2 dieses transfizierbaren Vektors wird in diesem Projekt verwendet^[157]. Es handelt sich dabei um ein gekoppeltes Fluorophorpaar, bestehend aus acGFP1 und mCherry.

In diesem Projekt wird die Gedrängtheit verschiedener zellulärer Fluide mit Hilfe orts aufgelöster FLPM-Messungen in lebenden HeLa-Zellen unter drei verschiedenen osmotischen Bedingungen an folgenden Stellen untersucht: Im Nukleus (**N**), im Zytoplasma nahe der Zellkernmembran (**CN**), im Zytoplasma (**C**) und im Zytoplasma nahe der Zellmembran (**CM**). Diese Messorte sind in Abb. 6.1 gezeigt. Die osmotischen Bedingungen sind: isoosmotisch ($c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$) und zwei verschiedene hyperosmotische Zustände ($c_{\text{osm}} = 0.6 \text{ Osm}$) und ($c_{\text{osm}} = 0.8 \text{ Osm}$), wobei letzterer als Grenzfall der Publikation von Sukenik et al.^[157] entnommen ist. Von der orts aufgelösten Messung der Lebenszeiten kann auf die FRET-Effizienzen geschlossen werden, die wiederum mit der Gedrängtheit des jeweiligen zellulären Fluids verknüpft sind.

6.1. Materialien und Methoden

In diesem Abschnitt wird die Vorbereitung der HeLa-Zellen und die Transfektion dieser mit dem *Crowding*-Sensor vorgestellt und die Herstellung von hyperosmotischen Mikroskopiemedien sowie das experimentelle Vorgehen bei FLPM-Messungen beschrieben. Die Zellen wurden wie in Kapitel 2.1 beschrieben kultiviert. Der FRET-Sensor fCrH2 wurde von der Gruppe um Martin Gruebele (University of Illinois) erworben.

6.1.1. Transfektion der Zellen

24 h nach dem Aussäen der Zellen in 4-well Probenkammern, mit etwa $5 \cdot 10^4$ Zellen/Kammer, wurde zuerst das Zellnährmedium gewechselt (500 μ l pro Kammer). FuGene6 wurde auf Raumtemperatur ($\sim 20^\circ\text{C}$) gebracht und mit einem Vortexer homogenisiert. 100 μ l OptiMem wurde in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben und 3 μ l FuGene6 mittig dazugegeben. Auf die Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur folgte die wiederum mittige Zugabe von 1 μ g fCrH2-DNA. Diese Lösung wurde für etwa 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gleichmäßig auf alle vier Probenkammern verteilt. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO_2 konnten Messungen an den Zellen durchgeführt werden.

6.1.2. Herstellung von hyperosmotischem Mikroskopiemedium

Die Osmolarität des Mikroskopiemediums wurde mit Hilfe der freundlichen Zusammenarbeit des Lehrstuhls Pflanzenphysiologie - Universität Bayreuth eingestellt. Diese erlaubten die Benutzung des Gerätes Osmomat-030 (gonotec - Berlin), welcher die Osmolarität eines Fluids über den Effekt der Gefrierpunktserniedrigung^[165] misst. Unter sukzessiver Zugabe von NaCl wurde die Osmolarität c_{osm} des Mikroskopiemediums [Kapitel 2.1] von ursprünglich $c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ (isoosmotisch) auf $c_{\text{osm}} = 0.6 \text{ Osm}$ (hyperosmotisch) bzw. auf $c_{\text{osm}} = 0.8 \text{ Osm}$ (hyperosmotisch) erhöht. Die hyperosmotischen Mikroskopiemedien wurden einmal wie beschrieben erstellt und für alle Messungen dieselben Medien verwendet, womit eine Streuung der Osmolarität als Fehlerquelle ausgeschlossen werden kann.

6.1.3. Experimente

Die Experimente in diesem Projekt sind fluoreszenzspektroskopische Messungen an HeLa-Zellen im isoosmotischen und hyperosmotischen Zustand. Die Messungen bestehen aus fluoreszenzmikroskopischer Bildgebung (*imaging*) und FLPM-Experimenten. Je Probenkammer wird eine Zelle im isoosmotischen und hyperosmotischen Zustand gemessen. Der Ablauf der Experimente ist: Bildgebung, FLPM im isoosmotischen Zustand, Wechsel des isoosmotischen Mikroskopiemediums auf hyperosmotisches Mikroskopiemedium, Bildgebung, FLPM im hyperosmotischen Zustand. Der Mediumwechsel war entweder von isoosmotisch, $c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ auf $c_{\text{osm}} = 0.6 \text{ Osm}$ oder von isoosmotisch auf $c_{\text{osm}} = 0.8 \text{ Osm}$. Je Behandlungsart, $0.3 \text{ Osm} \rightarrow 0.6 \text{ Osm}$ und $0.3 \text{ Osm} \rightarrow 0.8 \text{ Osm}$, tragen $N_{\text{cell}} = 16$ Zellen zum Ensemble bei.

Verwendet wurde ein Wasserimmersionsobjektiv mit der Vergrößerung $M_{\text{Obj}} = 63$ und der numerischen Apertur $NA = 1.2$. Das Pinhole wurde für alle Experimente auf $PH = 1 \text{ AU} = 108.37 \mu\text{m}$ fest eingestellt. Ein gepulster Laser mit der Wellenlänge $\lambda = 470 \text{ nm}$ und der Pulsfrequenz $f_{\text{ex}} = 40 \text{ MHz}$ wurde bei niedrigen Laserintensitäten verwendet. Der Detektionsbereich war $\Delta\lambda_{\text{det}} = 500 - 550 \text{ nm}$.

Bildgebung

Fluoreszenzbilder wurden mit $N_x \times N_y = 512 \times 512$ Pixel, variabler Pixelgröße und der Abtastfrequenz $f_{\text{scan}} = 400 \text{ Hz}$ aufgenommen. Die Option *frame-average* wurde auf $N_{\text{av}} = 3$ eingestellt. Bei dieser Option werden N_{av} Bilder hintereinander aufgenommen und anschließend gemittelt.

Zusätzlich wurden auch die Durchlichtbilder der Zellen aufgenommen. Abb. 6.1 zeigt Fluoreszenzbilder und Durchlichtbilder von HeLa-Zellen im isoosmotischen und hyperosmotischen Zustand. In den Fluoreszenzbildern sind die physiologischen Veränderungen wie die Ausbreitung der Stressfasern (SF) zu sehen.

FLPM-Experimente

Es werden vier Orte zur Messung gewählt von denen zwei klar definiert sind, das Nukleoplasma und das Zytoplasma und zwei weitere tendenzieller Natur sind. Letztere befinden sich ebenfalls im Zytoplasma, sind aber entweder „nahe“ am Nukleus oder „nahe“ an der äußeren Zellmembran situiert. Die Position dieser Messorte ist in Abb. 6.1 gezeigt. Im Anschluss werden gemäß der FLPM-Methode [Kapitel 3.1.2] Experimente durchgeführt.

Zuerst wurden die vier Positionen in der Zelle markiert und je Messort für $T_{\text{mess}} = 60 \text{ s}$ im FCS-Modus des Leica-TCS-SP5-Mikroskops Photonenankunftszeiten gemessen. Im Anschluss folgt der Wechsel des Mikroskopiemediums auf das hyperosmotische mit 3 min Einwirkzeit. Im Falle von U2OS-Zellen berichteten Sukenik et al.^[157], dass bereits nach 60 s Einwirkzeit der stationäre Zustand des Wasseraustauschs erreicht wird. Da osmotischer Stress im betrachteten Bereich reversibel ist, ist die längere Einwirkzeit unproblematisch und wird gewählt, um einen hyperosmotischen Gleichgewichtszustand sicherzustellen. Zuletzt werden an denselben Orten die Messungen im hyperosmotischen Zustand durchgeführt.

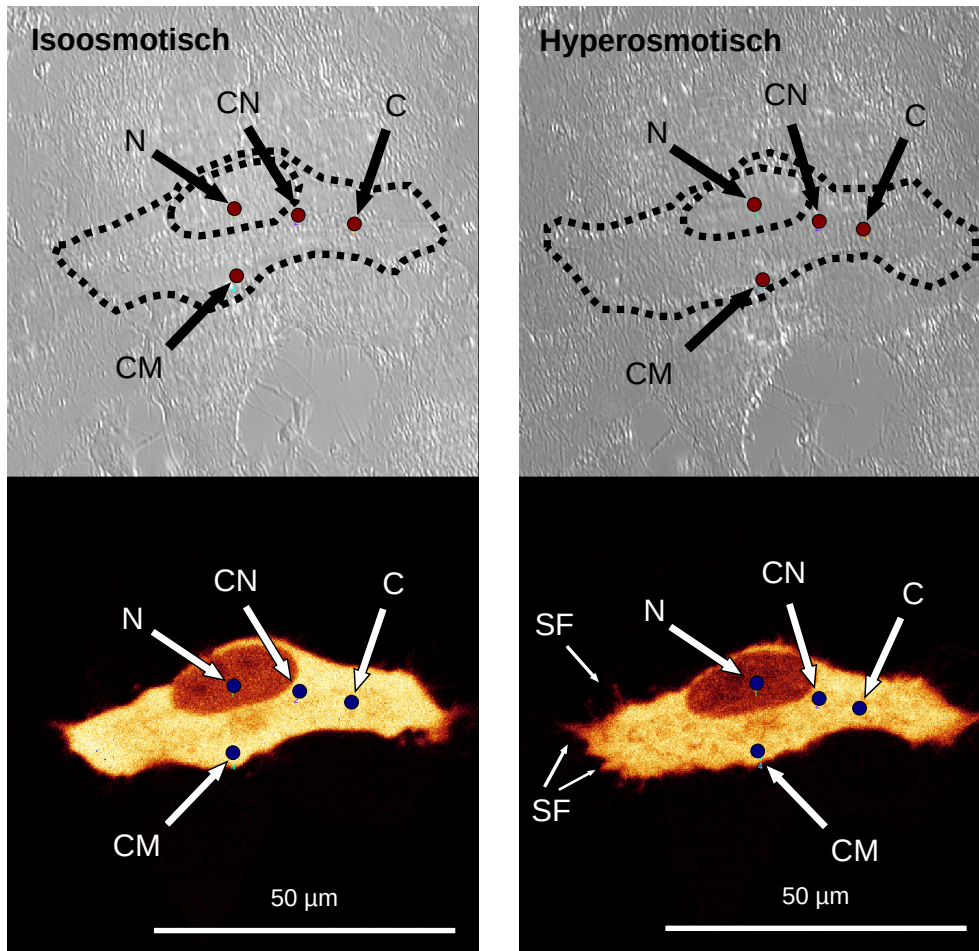


Abbildung 6.1.: Hyperosmotische Behandlung von HeLa-Zellen. Gezeigt sind Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen einer HeLa-Zelle mit transfiziertem fCrH2 vor und nach der Behandlung mit hyperosmotischem Mikroskopiemedium. Anregung mit gepulstem Laser: $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, $f_{\text{ex}} = 40 \text{ MHz}$. **Links:** Durchlicht- und Fluoreszenzbild einer HeLa-Zelle im isoosmotischen Zustand. Es besteht kein osmotischer Druckunterschied zwischen dem Mikroskopiemedium und dem Zellinneren. **Rechts:** Durchlicht und Fluoreszenzbild derselben HeLa-Zelle im hyperosmotischen Milieu. **Oben:** Durchlichtbild der Zelle mit der Markierung der Messpunkte und der Umrandung der Zellmembran sowie des Zellkerns. **Unten:** Fluoreszenzaufnahme der Zelle mit der Markierung der Messpunkte und einiger Stressfasern. 3 min nach dem Mediumwechsel auf das hyperosmotische Medium (hier: $c_{\text{osm}} = 0.8 \text{ Osm}$) flacht die Zelle ab, Wasser diffundiert durch die selektiv permeable Zellmembran aus der Zelle in das umgebende Medium, um die Konzentration osmotisch aktiver Teilchen, hier hydratisierte Natrium- und Chlorid-Ionen, im Gleichgewicht zu halten. Die Abflachung der Zelle nach hyperosmotischer Behandlung ist an der Ausprägung der Stressfasern **SF** zu erkennen. Die Stressfasern sind gut sichtbar, da die Fokalebene durch die Abflachung näher an der Adhäsionsebene der Zelle liegt als im isoosmotischen Zustand. Messungen **N**: Nukleus, **CN**: Zytoplasma (nahe dem Zellkern), **C**: Zytoplasma, **CM**: Zytoplasma (nahe der äußeren Zellmembran). Die Messdauer je Messort betrug $T_{\text{mess}} = 60 \text{ s}$. Diese Abbildung dient als Referenz für die Bezeichnung „nahe“, die in diesem Kapitel verwendet wird.

6.2. Resultate

Wesentliche Ergebnisse

Der *Crowding*-Sensor fCrH2 kann zuverlässig den Unterschied der Gedrängtheit zwischen isoosmotischen zellulären Fluiden und solchen unter osmotischem Stresseinfluss wiedergeben. Die Spezifität des Sensors, intrazelluläre Unterschiede der Gedrängtheit im isoosmotischen oder hyperosmotischen Zustand zu messen, ist allerdings gering und schwankt von Messung zu Messung. Für den Zusammenhang zwischen der Osmolarität und der FRET-Effizienz wird ein exponentielles Modell vorgeschlagen.

In diesem Kapitel wird mit Hilfe des FRET-Sensors fCrH2 die Gedrängtheit zellulärer Fluide in HeLa-Zellen im Nukleoplasma und in der zytoplasmischen Region [Abb. 6.1] untersucht. Anhand der Spezifität des Sensors wird auch dessen Einsatz als *Crowding*-Sensor beurteilt. Die angewendete Messmethode wird LT-FRET [Kapitel 1.2.3] genannt. Die zugänglichen Auswertegrößen sind die Lebenszeit und die Lebenszeitfraktion des FRET-Sensors.

Im Verlauf des ersten Abschnittes wird räumlich aufgelöst sowohl die FRET-Effizienz als auch die FRET-Aktivität des Sensors untersucht und die intrazelluläre Unterscheidbarkeit der Gedrängtheit mit Hilfe des Wilcoxon-Ranksum-Tests geprüft. Der zweite Abschnitt befasst sich mit der räumlich aufgelösten Zunahme der FRET-Effizienzen und der Abhängigkeit der FRET-Effizienzunterschiede von der hyperosmotischen Stressbehandlung.

Beide Fluorophore des FRET-Paares fCrH2 sind einfache Fluorophore, die jeweils eine Lebenszeit im zugehörigen Emissionsspektrum haben und werden Donor und Akzeptor genannt, siehe Kapitel 2.4 zum verwendeten FRET-Sensor. Bei der Anpassung experimenteller Ankunftszeithistogramme von FRET-Sensoren erhält man typischerweise einen doppelexponentiellen Zerfall, der auf das Vorhandensein von FRET hinweist.

Im grünen Kanal, $\Delta\lambda_{\text{det}} = 500 - 550 \text{ nm}$, sind zwei Lebenszeiten messbar, die mit zwei Extremfällen des Sensors verknüpft sind. Die Lebenszeit des Donors τ_D tritt auf, wenn die Fluorophorpaare weit entfernt voneinander sind und kein Energieübertrag vom Donor zum Akzeptor erfolgt. Die Lebenszeit des Donor-Akzeptor-Paares τ_{DA} tritt dagegen auf, wenn sich Donor und Akzeptor im Abstand weniger Nanometer zueinander befinden und der Donor strahlungslos Energie an den Akzeptor überträgt. Die Auswertung der FRET-Effizienzen erfordert daher lediglich die Messung der Lebenszeiten des Donors^[166] im grünen Kanal. Um die beiden Lebenszeiten τ_D und τ_{DA} zu bestimmen, werden im ersten Schritt die Ankunftszeithistogramme nach der Hintergrundkorrektur [Kapitel 3.2.1] mit Hilfe des in Kapitel 3.2.2 vorgestellten Fitalgorithmus angepasst.

Diejenige der beiden Lebenszeiten, die sich bei der Messung unter isoosmotischen Bedingungen im Vergleich zu hyperosmotischen Bedingungen am stärksten ändert, wird als die Lebenszeit τ_{DA} des FRET-Paares betrachtet. Die andere Lebenszeit τ_{D} wird dem Donor allein zugewiesen.

Da die doppel-exponentielle Kurvenanpassung schwankende Donorlebenszeiten ergibt, obwohl sich die Lebenszeit des Donors τ_{D} ohne FRET-Aktivität nicht ändern sollte, wird der Literaturwert von acGFP1: $\tau_{\text{D}} = 2.81 \text{ ns}$ der Publikation von Zhang et al.^[167] entnommen und in einem abgewandelten Anpassungsmodell als Konstante verwendet:

$$F_{\text{m}}(\tau_{\text{A}}) = \xi_{\text{st}}[f_{\text{DA}} \exp(-\tau_{\text{A}}/\tau_{\text{DA}}) + (1 - f_{\text{DA}}) \exp(-\tau_{\text{A}}/2.81 \text{ ns})]$$

Bei diesem Anpassungsmodell handelt sich um einen semi-doppel-exponentiellen Ansatz, bei dem zwei gekoppelte Vorfaktoren $f_{\text{D}} = 1 - f_{\text{DA}}$ und eine Lebenszeit $\tau_1 = \tau_{\text{DA}}$ als Freiheitsgrade verfügbar sind. Durch diese Reduktion der Fitparameter wird die Zuverlässigkeit der Resultate erhöht, gleichzeitig aber auch vorausgesetzt, dass die Lebenszeitverringerung des Donors allein auf den strahlungslosen Energieübertrag durch FRET beschränkt ist.

6.2.1. Unterscheidbarkeit intrazellulärer Gedrängtheit

In diesem Abschnitt wird die lokale Gedrängtheit an den vier verschiedenen Messorten in Abb. 6.1 untersucht und geklärt, ob die Sensitivität des Sensors für die Unterscheidung der Gedrängtheit an den Messorten innerhalb derselben Zelle ausreicht. Der Zugang zu den FRET-Effizienzen E_{FRET} erfolgt im Falle von LT-FRET über die Donor-Akzeptor-Lebenszeiten τ_{DA} :

$$E_{\text{FRET}} = 1 - \frac{\tau_{\text{DA}}}{\tau_{\text{D}}}. \quad (6.1)$$

Der Fehler der FRET-Effizienz $s_{E_{\text{FRET}}} = s_{\text{F}}$ folgt dem Fehlerfortpflanzungsgesetz [Gl. (3.15)]. Die Lebenszeitfraktion des Donor-Akzeptor-Paares λ_{DA} wird berechnet [Gl. (6.2)], wobei f_{DA} der Vorfaktor von τ_{DA} aus der Kurvenanpassung ist und $f_{\text{DA}} = 1 - f_{\text{D}}$ gilt.

$$\lambda_{\text{DA}} = \frac{f_{\text{DA}} \tau_{\text{DA}}}{f_{\text{DA}}(\tau_{\text{DA}} - \tau_{\text{D}}) + \tau_{\text{D}}} \quad (6.2)$$

Abb. 6.2 und Abb. 6.3 zeigen die räumlich aufgelöste Auswertung der FRET-Effizienzen E_{FRET} und FRET-Aktivitäten vor und nach der hyperosmotischen Behandlung. Die FRET-Aktivität spiegelt sich in der Donor-Akzeptor-Lebenszeitfraktion λ_{DA} wider. Dabei ist die FRET-Effizienz ein Maß für die räumliche Nähe des Donors und des Akzeptors. Die FRET-Aktivität dagegen ist ein Maß für den prozentualen Anteil FRET-aktiver Fluorophorpaare gegenüber inaktiven Fluorophorpaaren. In der folgenden qualitativen Beschreibung steht der Superskript „U“ für Zellen im isoosmotischen Zustand und „T“ für Zellen in den jeweiligen hyperosmotischen Zuständen.

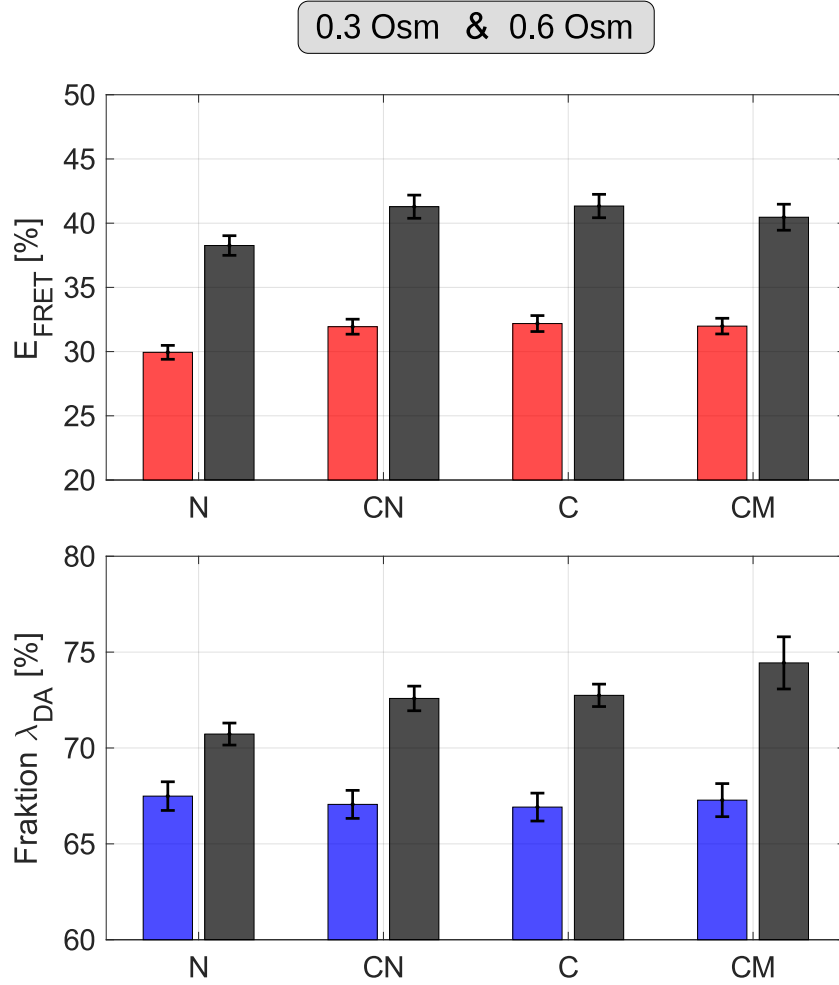


Abbildung 6.2.: FRET-Effizienzen E_{FRET} und Fraktionen λ_{DA} bei 0.3 Osm und 0.6 Osm. **Oben:** Die FRET-Effizienzen der FLPM-Messungen vor und nach hyperosmotischer Behandlung im Nukleoplasma (N), nahe dem Zellkern (CN), im Zytoplasma (C) und nahe der äußeren Zellmembran (CM). **Unten:** Fraktionen λ_{DA} FRET-aktiver Moleküle an denselben Messorten vor und nach der hyperosmotischen Behandlung. Im Balkendiagramm gezeigt sind absolute FRET-Effizienzen E_{FRET} vor (**rot**) und nach (**schwarz**) hyperosmotischer Behandlung mit 0.6 Osm Mikroskopiemedium sowie die Fraktion FRET-aktiver Moleküle λ_{DA} davor (**blau**) und danach (**schwarz**). Die Fehlerbalken sind bei E_{FRET} die Fehler gemäß dem Fehlerfortpflanzungsgesetz, s_{F} , und bei λ_{DA} die Fehler des Mittelwertes, s_{E} . Die Ansicht ist auf FRET-Effizienzen zwischen $E_{\text{FRET}} = 20\%$ und $E_{\text{FRET}} = 50\%$ und auf zugehörige Fraktionen zwischen $\lambda_{\text{DA}} = 60\%$ bis $\lambda_{\text{DA}} = 80\%$ begrenzt.

Betrachtet man die Experimente mit $c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ und $c_{\text{osm}} = 0.6 \text{ Osm}$ in Abb. 6.2 fällt auf, dass sich die FRET-Effizienzen im Nukleoplasma- und Zytoplasmabereich sowohl vor als auch nach der hyperosmotischen Behandlung unterscheiden. Im Zytoplasma selbst sind die Unterschiede zwischen Zellkernnähe, Zytoplasma und Zellmembrannähe sowohl vor als auch nach der Behandlung gering [Gl. (6.3)].

$$\begin{aligned}
 0.3 \text{ Osm} &\rightarrow E_{\text{FRET},\text{N}} < E_{\text{FRET},\text{CN}} \approx E_{\text{FRET},\text{C}} \approx E_{\text{FRET},\text{CM}} \\
 0.6 \text{ Osm} &\rightarrow E_{\text{FRET},\text{N}} < E_{\text{FRET},\text{CN}} \approx E_{\text{FRET},\text{C}} \approx E_{\text{FRET},\text{CM}}
 \end{aligned} \tag{6.3}$$

Die Fraktion λ_{DA} FRET-aktiver Moleküle ist vor der Behandlung im isoosmotischen Zustand an den Messorten etwa gleich. Nach der Behandlung steigt λ_{DA} abhängig von der Entfernung vom Nukleus an und ist in Zellmembrannähe maximal. Im Zytoplasma nahe dem Zellkern und im Zytoplasma ist die Fraktion nahezu identisch. Dieser Sachverhalt ist in Gl. (6.4) gezeigt.

$$\begin{aligned} 0.3 \text{ Osm} &\rightarrow \lambda_{\text{DA},\text{N}} \approx \lambda_{\text{DA},\text{CN}} \approx \lambda_{\text{DA},\text{C}} \approx \lambda_{\text{DA},\text{CM}} \\ 0.6 \text{ Osm} &\rightarrow \lambda_{\text{DA},\text{N}} < \lambda_{\text{DA},\text{CN}} \approx \lambda_{\text{DA},\text{C}} < \lambda_{\text{DA},\text{CM}} \end{aligned} \quad (6.4)$$

Betrachtet man die Experimente mit $c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ und $c_{\text{osm}} = 0.8 \text{ Osm}$ in Abb. 6.3 fällt auf, dass sich die FRET-Effizienzen E_{FRET} im Nukleoplasma und Zytoplasmabereich vor der hyperosmotischen Behandlung geringfügig unterscheiden. Nach der Behandlung ist der Unterschied zwischen Nukleoplasma und Zytoplasmabereich etwas größer. Die FRET-Effizienzen E_{FRET} sind im zytoplasmischen Bereich sehr ähnlich. Diese qualitative Betrachtung ist in Gl. (6.5) zusammengefasst.

$$\begin{aligned} 0.3 \text{ Osm} &\rightarrow E_{\text{FRET},\text{N}} < E_{\text{FRET},\text{CN}} \approx E_{\text{FRET},\text{C}} \approx E_{\text{FRET},\text{CM}} \\ 0.8 \text{ Osm} &\rightarrow E_{\text{FRET},\text{N}} < E_{\text{FRET},\text{CN}} \approx E_{\text{FRET},\text{C}} \approx E_{\text{FRET},\text{CM}} \end{aligned} \quad (6.5)$$

Die Fraktion λ_{DA} FRET-aktiver Moleküle schwankt vor der Behandlung im isoosmotischen Zustand. Die höchste Fraktion λ_{DA} wird vor der Behandlung im Zytoplasma nahe des Zellkerns erreicht, gefolgt vom Zellkern, im Zytoplasma nahe äußeren Zellmembran und schließlich der geringsten Fraktion im Zytoplasma selbst. Nach der Behandlung steigt λ_{DA} im zytoplasmischen Bereich an und ist in Zellmembrannähe maximal [Gl. (6.6)].

$$\begin{aligned} 0.3 \text{ Osm} &\rightarrow \lambda_{\text{DA},\text{N}} < \lambda_{\text{DA},\text{CN}} > \lambda_{\text{DA},\text{C}} \approx \lambda_{\text{DA},\text{CM}} \\ 0.8 \text{ Osm} &\rightarrow \lambda_{\text{DA},\text{N}} < \lambda_{\text{DA},\text{CN}} \approx \lambda_{\text{DA},\text{C}} \approx \lambda_{\text{DA},\text{CM}} \end{aligned} \quad (6.6)$$

Da die FRET-Effizienzen im hyperosmotischen Zustand sowohl bei $c_{\text{osm}} = 0.6 \text{ Osm}$ als auch $c_{\text{osm}} = 0.8 \text{ Osm}$ bei $E_{\text{FRET}} \approx 40\%$ liegen, wird gefolgert, dass der mittlere Abstand des Donors und Akzeptors r größer als der Försterradius R_{F} des Sensors ist.

Als nächstes wird die qualitative Betrachtung der Unterschiede intrazellulärer Gedrängtheit durch eine quantitative Untersuchung mit Hilfe des Wilcoxon-Ranksum-Tests bei verschiedenen Signifikanzniveaus ergänzt. Hierbei wird geprüft, ob und ab welchem Signifikanzniveau die Spezifität des FRET-Sensors ausreicht, um die Unterschiede der Gedrängtheit an den vier Messorten wiederzugeben. Da die Donor-Akzeptor-Lebenszeit die einzige Variable in der Bestimmung der FRET-Effizienz [Gl. (6.1)] ist, beschränkt sich die folgende Untersuchung auf die FRET-Lebenszeit τ_{DA} und die FRET-Aktivität λ_{DA} .

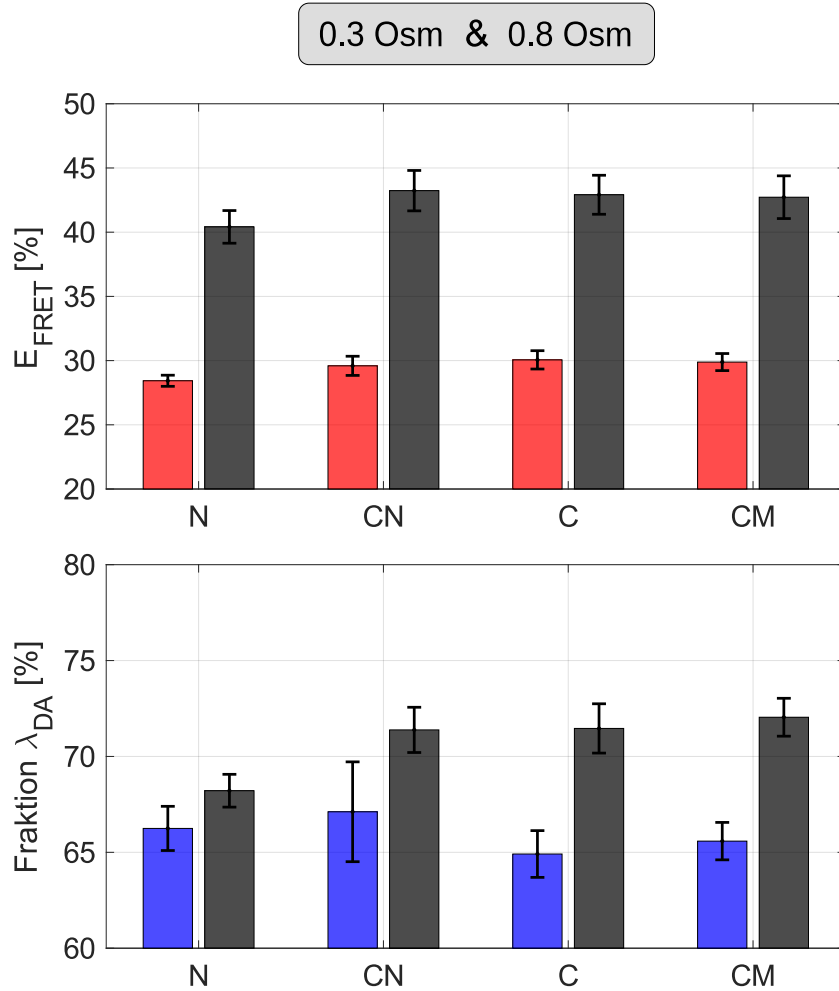


Abbildung 6.3.: FRET-Effizienzen E_{FRET} und Fraktionen λ_{DA} bei 0.3 Osm und 0.8 Osm.
Oben: Die FRET-Effizienzen der FLPM-Messungen vor und nach hyperosmotischer Behandlung im Nukleoplasma (N), nahe dem Zellkern (CN), im Zytoplasma (C) und nahe der äußeren Zellmembran (CM). **Unten:** Fraktionen λ_{DA} FRET-aktiver Moleküle vor und nach der hyperosmotischen Behandlung. Im Balkendiagramm gezeigt sind absolute FRET-Effizienzen E_{FRET} vor (**rot**) und nach (**schwarz**) hyperosmotischer Behandlung mit 0.8 Osm Mikroskopiemedium sowie die Fraktion FRET-aktiver Moleküle λ_{DA} davor (**blau**) und danach (**schwarz**). Die Fehlerbalken sind bei E_{FRET} die Fehler gemäß dem Fehlerfortpflanzungsgesetz s_F , und bei λ_{DA} die Fehler des Mittelwertes, s_E . Die Ansicht ist auf FRET-Effizienzen zwischen $E_{\text{FRET}} = 20\%$ und $E_{\text{FRET}} = 50\%$ und auf zugehörige Fraktionen zwischen $\lambda_{\text{DA}} = 60\%$ bis $\lambda_{\text{DA}} = 80\%$ begrenzt.

Allgemein bekannt ist, dass das Zellinnere aufgrund vieler tausend verschiedener Makromoleküle gedrängt ist. Guigas et al.^[168] stellten zudem fest, dass das Zytoplasma im Vergleich zum Zellkern tendenziell etwas gedrängter ist. Dieses qualitative Ergebnis zeigen auch Gl. (6.3) und Gl. (6.5).

Um dies zu prüfen, kann man die Verteilungen der regionsspezifischen Lebenszeiten untereinander je vor und nach der hyperosmotischen Behandlung vergleichen. Hierfür wurden alle möglichen Kombinationen der vier Messorte verglichen. N-CN: der Zellkern mit der kernnahen Region des Zytoplasmas, N-C: der Zellkern mit dem Zytoplasma,

N-CM: der Zellkern mit der membrannahen Region des Zytoplasmas, CN-C: die kernnahe Region des Zytoplasmas mit dem Zytoplasma, CN-CM: die kernnahe Region des Zytoplasmas mit der membrannahen Region desselben und C-CM: das Zytoplasma mit der membrannahen Region desselben.

Der hyperosmotische Stress, der auf die Zellmembran wirkt, kann durch die Differenz der Osmolaritäten des Mikroskopiemediums und des Zellinneren durch Δc_{osm} ausgedrückt werden. Aus den drei untersuchten osmotischen Zuständen $c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$, $c_{\text{osm}} = 0.6 \text{ Osm}$ und $c_{\text{osm}} = 0.8 \text{ Osm}$ lassen sich zwei verschiedene Osmolaritätsunterschiede, $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ und $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$, berechnen. Tab. 6.1 zeigt die Ergebnisse intrazellulärer, signifikanter Gedrängtheitsunterschiede bei $\alpha = 0.01$, $\alpha = 0.05$ und $\alpha = 0.1$ unter Verwendung der Osmolaritätsunterschiede Δc_{osm} .

W-RS TEST $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$					W-RS TEST $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$				
	τ^U	λ^U	τ^T	λ^T		τ^U	λ^U	τ^T	λ^T
N-CN	Y	-	Y	Y	N-CN	-	-	-	Y
N-C	Y	-	Y	Y	N-C	Y	-	-	Y
N-CM	Y	-	Y	Y	N-CM	Y	-	-	Y
CN-C	-	-	-	-	CN-C	-	-	-	-
CN-CM	-	-	-	-	CN-CM	-	-	-	-
C-CM	-	-	-	-	C-CM	-	-	-	-

Tabelle 6.1.: Regionsübergreifende Unterschiede der Donor-Akzeptor-Lebenszeiten und Fraktionen von fCrH2. (Wilcoxon-Ranksum-Test) Statistische Analyse mit Hilfe des Wilcoxon-Ranksum-Tests (**W-RS TEST**) bei den Signifikanzniveaus **Y**, $\alpha = 0.01$, **Y**, $\alpha = 0.05$ und **Y**, $\alpha = 0.1$. **Y**: Signifikanter Unterschied der Donor-Akzeptor-Lebenszeiten τ_{DA} und Donor-Akzeptor-Fractionen λ_{DA} bei farblich kodiertem α . In allen Fällen ist das niedrigste Signifikanzniveau gezeigt, bei dem ein signifikanter Unterschied der Verteilungen bezüglich ihres Medianwertes vorhanden ist. Bei höheren Signifikanzniveaus als den angegebenen ist per Definition ein Unterschied der Medianwerte vorhanden. Aus Platzgründen ist hier τ_{DA} durch $\tau_{\text{DA}} =: \tau^{U,T}$ und λ_{DA} durch $\lambda_{\text{DA}} =: \lambda^{U,T}$ mit den Superskripten U: isoosmotischer Zustand und T: hyperosmotischer Zustand abgekürzt. -: Kein signifikanter Unterschied bei den geprüften $\alpha = 0.01 - 0.1$. Die Zusammenfassung bezieht sich auf die Verteilung der Donor-Akzeptor Lebenszeiten τ_{DA} und Donor-Akzeptor Fractionen λ_{DA} , deren Mittelwerte und Fehler umgerechnet in FRET-Effizienzen E_{FRET} in Abb. 6.2 und Abb. 6.3 dargestellt sind. Gezeigt ist die Signifikanz regionsübergreifender Unterschiede der Donor-Akzeptor-Lebenszeiten τ_{DA} und deren Fractionen λ_{DA} im isoosmotischen Zustand $\Delta c_{\text{osm}} = 0 \text{ Osm}$ (U), $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ (T) sowie $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$ (T). Die Vergleiche der Messorte untereinander beziehen sich auf **N**: im Nukleus, **CN**: im Zytoplasma nahe des Nukleus, **C**: im Zytoplasma und **CM**: im Zytoplasma nahe der äußeren Zellmembran. Der größte Unterschied der Donor-Akzeptor-Lebenszeiten ist zwischen dem Nukleoplasma und der zytoplasmischen Region messbar. Die zytoplasmischen Regionen sind untereinander bei keinem der geprüften Signifikanzniveaus unterschiedlich bezüglich τ_{DA} und λ_{DA} .

Insgesamt erhält man bei gleichem Signifikanzniveau keine konsistenten Resultate bezüglich der Unterscheidbarkeit der Gedrängtheit verschiedener Zellregionen. Während bei dem Experiment mit $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ sowohl vor als auch nach der Behandlung bei $\alpha = 0.01$ ein Unterschied in der Gedrängtheit des Zellkerns und des Zytoplasmas

messbar ist, ist dieser Unterschied bei $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$ und gleichem α weder vor noch nach der Behandlung vorhanden. Erst bei $\alpha = 0.1$ wird dieser Unterschied erkennbar. Des Weiteren fällt auf, dass bei keinem der geprüften Signifikanzniveaus in λ^U regionsübergreifende Unterschiede zu finden sind. Dies deutet darauf hin, dass die Zahl FRET-aktiver Moleküle im isoosmotischen Zustand regionsübergreifend sehr ähnlich ist. Außerdem fällt auf, dass bei allen geprüften Signifikanzniveaus sich die Gebiete im Zytoplasma: C, CN und CM bezüglich der gemessenen FRET-Effizienz und dem Verhältnis FRET-aktiver Moleküle nicht signifikant unterscheiden.

6.2.2. Lokale Gedrängtheitszunahme unter Stresszunahme

In diesem Abschnitt wird die Reaktion des FRET-Sensors auf die Zunahme osmotischen Stresses im Bezug zum Osmolaritätsunterschied Δc_{osm} untersucht. Mit den Osmolaritätsunterschieden $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ und $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$ verknüpfte FRET-Effizienzunterschiede ΔE_{FRET} werden nach Gl. (6.7) für jeden Messort berechnet, mit dem Superskript „T“ für hyperosmotisch und „U“ für isoosmotisch. Der Fehler der FRET-Differenzen $s_{\Delta E_{\text{FRET}}} = s_D$ wird nach Gl. (3.16) berechnet.

$$\Delta E_{\text{FRET}} = E_{\text{FRET}}^T - E_{\text{FRET}}^U \quad (6.7)$$

Abb. 6.4 zeigt die FRET-Differenzen zwischen isoosmotischem und hyperosmotischem Zustand an allen Messorten. Die Zunahme der FRET-Effizienz ΔE_{FRET} ist im Vergleich von isoosmotischem zu hyperosmotischem Zustand an allen Messorten deutlich. Bei der Behandlung mit $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ zeigt sich, dass die Zunahme der FRET-Effizienzen im Zytoplasma nahe dem Nukleus am höchsten ist, gefolgt vom Zytoplasma nahe der äußeren Zellmembran, und schließlich am geringsten im Nukleus selbst ausfällt.

Wie schon bei der Behandlung mit dem Osmolaritätsunterschied des Mikroskopiemediums von $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$, ist auch im Stressszenario $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$ der Bereich nahe des Zellkerns im Zytoplasma mit der größten Änderung ΔE_{FRET} verknüpft. Die Zellkernnahe Region wird gefolgt vom Zytoplasma und schließlich der Region nahe der äußeren Zellmembran, wobei die letzten beiden sehr ähnlich sind. Die geringste Änderung der FRET-Effizienz zeigt, wie zuvor auch, der Nukleus. Die FRET-Effizienzunterschiede ΔE_{FRET} aller Messorte sind in Tab. 6.2 aufgeführt.

An allen Messorten N, CN, C, CM kann durch den Wechsel von isoosmotischem zu hyperosmotischem Mikroskopiemedium bei $\alpha = 0.01$ ein statistisch signifikanter Unterschied der FRET-Effizienzen und damit der Gedrängtheit nachgewiesen werden. Tab. 6.2 zeigt den jeweiligen prozentualen Unterschied mit zugehörigem Fehler und die Bewertung des Wilcoxon-Ranksum-Tests auf Signifikanz.

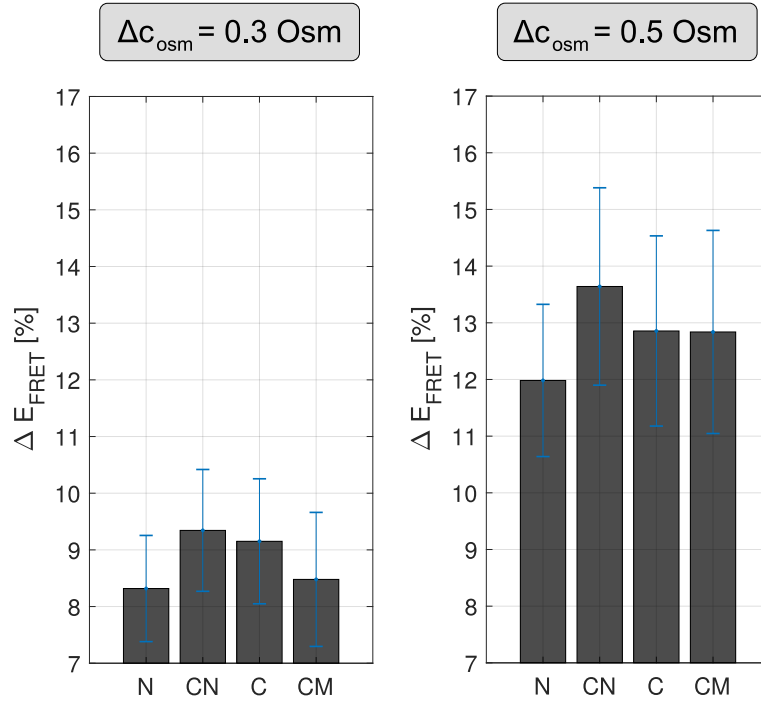


Abbildung 6.4.: Zunahme der FRET-Effizienzen in den Stressszenarien $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ und $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$. **N:** Nukleus, **CN:** Zytoplasma nahe dem Nukleus, **C:** Zytoplasma, **CM:** Zytoplasma nahe der äußeren Zellmembran. **Links:** Änderung der FRET-Effizienzen ΔE_{FRET} in den verschiedenen Zellregionen nach hyperosmotischer Behandlung mit 0.6 Osm Mikroskopiemedium. **Rechts:** Änderung der FRET-Effizienzen ΔE_{FRET} in den verschiedenen Zellregionen nach hyperosmotischer Behandlung mit 0.8 Osm Mikroskopiemedium. Die Fehlerbalken sind die Fehler der FRET-Differenzen, s_D .

W-RS TEST	N ^(T-U)	CN ^(T-U)	C ^(T-U)	CM ^(T-U)
$\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$	Y	Y	Y	Y
$\Delta E_{\text{FRET}} \pm s_D$ [%]	8.3 ± 0.9	9.3 ± 1.1	9.2 ± 1.1	8.5 ± 1.2
$\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$	Y	Y	Y	Y
$\Delta E_{\text{FRET}} \pm s_D$ [%]	12.0 ± 1.3	13.6 ± 1.7	12.9 ± 1.7	12.8 ± 1.8

Tabelle 6.2.: Regionsspezifische statistische Signifikanz und FRET-Differenzen durch die hyperosmotische Behandlung. Zusammenfassung der statistisch signifikanten Differenzen der FRET-Effizienzen bei den Stressszenarien $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ und $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$. **Y:** Signifikanter Unterschied der FRET-Effizienzen zwischen isoosmotischen (**U**) und hyperosmotischem (**T**) Zustand (**T-U**) bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0.01$. Neben dem Resultat des Wilcoxon-Ranksum-Tests zeigt die Tabelle die numerische Auswertung der FRET-Differenzen ΔE_{FRET} in den Stressszenarien $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ und $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$ an den vier Messorten, **N:** im Zellkern, **CN:** im Zytoplasma nahe dem Zellkern, **C:** im Zytoplasma und **CM:** im Zytoplasma nahe der äußeren Zellmembran, die in Abb. 6.4 gezeigt ist.

6.2.3. Modellbildung - Osmolarität und FRET-Effizienz

An dieser Stelle wird geprüft, wie der FRET-Effizienzunterschied ΔE_{FRET} mit dem zunehmenden Osmolaritätsunterschied zusammenhängt. Hierfür werden die FRET-Effizienzunterschiede gegen die Osmolaritätsunterschiede aus Tab. 6.2 in Abb. 6.5 aufgetragen. Die Unterschiede ΔE_{FRET} und Δc_{osm} werden betrachtet, da der Nullpunkt der FRET-Effizienzen im isoosmotischen Zustand von Messort zu Messort schwankt und keine Vergleichswerte für die FRET-Effizienzen von fCrH2 in HeLa-Zellen vorliegen.

Im Rahmen ihrer Fehler sind die FRET-Differenzen ΔE_{FRET} an allen Messorten, N, CN, C und CM ununterscheidbar [Tab. 6.2]. In Abb. 6.5 fällt bei $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ auf, dass die Effizienzunterschiede im Nukleoplasma (N) und im Zytoplasma nahe der Zellmembran (CM) sehr ähnliche Werte haben. Genauso sind auch die Effizienzunterschiede im Zytoplasma (C) und nahe am Nukleus (CN) sehr ähnlich. Die Werte von CM und C nähern sich dagegen bei $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$ an, während der größte Effizienzunterschied im Zytoplasma nahe des Zellkerns (CN) und der kleinste Effizienzunterschied im Nukleoplasma (N) erhalten bleibt.

Für die Entwicklung eines Modelles muss eine Initialannahme für die Abhängigkeit von ΔE_{FRET} und Δc_{osm} getroffen werden. Nimmt man an, dass die FRET-Effizienz bei Zunahme der Osmolarität nicht unbegrenzt ansteigt, kommt eine saturierende Funktion, in erster Näherung ein exponentielles Modell [Gl. (6.8)], für die Beschreibung der FRET-Effizienzzunahme in Abhängigkeit der Osmolaritätszunahme in Frage. Diese Annahme kann dadurch begründet werden, dass bei sehr hohen positiven Osmolaritätsunterschieden der Großteil des intrazellulären Wassers in das Mikroskopiemedium transportiert wird und die Zelle auf ein Mindestvolumen schrumpft. Bei dem vorgeschlagenen Modell handelt es sich um eine rein heuristische Beschreibung der Daten, die gleichzeitig die Grenzfälle und das nichtlineare Verhalten der FRET-Effizienz enthält.

$$\Delta E_{\text{FRET}}(\Delta c_{\text{osm}}) = \Delta E_{\text{FRET}}^{\text{max}} \left[1 - \exp \left(-\frac{\Delta c_{\text{osm}}}{\tau_{\Delta c}} \right) \right] \quad (6.8)$$

Dieses Modell [Gl. (6.8)] enthält bereits die Grundannahme, dass ohne Osmolaritätszunahme keine FRET-Effizienzzunahme existiert:

$$\Delta E_{\text{FRET}}(\Delta c_{\text{osm}} = 0) = 0.$$

Bei zwei freien Parametern $\Delta E_{\text{FRET}}^{\text{max}}$ und $\tau_{\Delta c}$ und lediglich zwei Osmolaritätsunterschieden $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ und $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$ können die Modellparameter über ein lineares Gleichungssystem analytisch bestimmt werden. Man erhält für die verschiedenen Messorte (N, CN, C, CM) die Modellparameter in Tab. 6.3.

Das beschriebene Modell sagt voraus, dass je Messort verschiedene Grenzwerte der FRET-Effizienzzunahme erreicht werden können. Die höchste Effizienzzunahme wird im Zytoplasma nahe der äußeren Zellmembran erreicht und die geringste im Zytoplasma

selbst. Die Grenzfälle der FRET-Effizienzzunahmen bei sehr großen Osmolaritätsunterschieden $\Delta c_{\text{osm}} \rightarrow \infty$ ordnen sich wie folgt an:

$$\Delta E_{\text{FRET},\text{C}}^{\text{max}} < \Delta E_{\text{FRET},\text{N}}^{\text{max}} < \Delta E_{\text{FRET},\text{CN}}^{\text{max}} < \Delta E_{\text{FRET},\text{CM}}^{\text{max}}.$$

MESSORTE	$\tau_{\Delta c}$ [Osm]	$\Delta E_{\text{FRET}}^{\text{max}}$ [%]
Nukleoplasma (N)	0.63	21.89
Zytoplasma, nahe dem Zellkern (CN)	0.69	26.42
Zytoplasma (C)	0.50	20.47
Zytoplasma, nahe der Zellmembran (CM)	0.91	30.38

Tabelle 6.3.: Anstiegskonstanten und Grenzwerte der FRET-Effizienzzunahme. Die Anstiegskonstante ist im Zytoplasma am geringsten, nahe der Zellmembran am größten. Der größte intrazelluläre Unterschied der FRET-Effizienzzunahme wird zwischen dem Zytoplasma und dem Messort im Zytoplasma nahe der äußeren Zellmembran vorhergesagt und beträgt im Grenzfall sehr großer Osmolaritätsunterschiede $\Delta(\Delta E_{\text{FRET}})_{\text{C-CM}} \approx 10\%$.

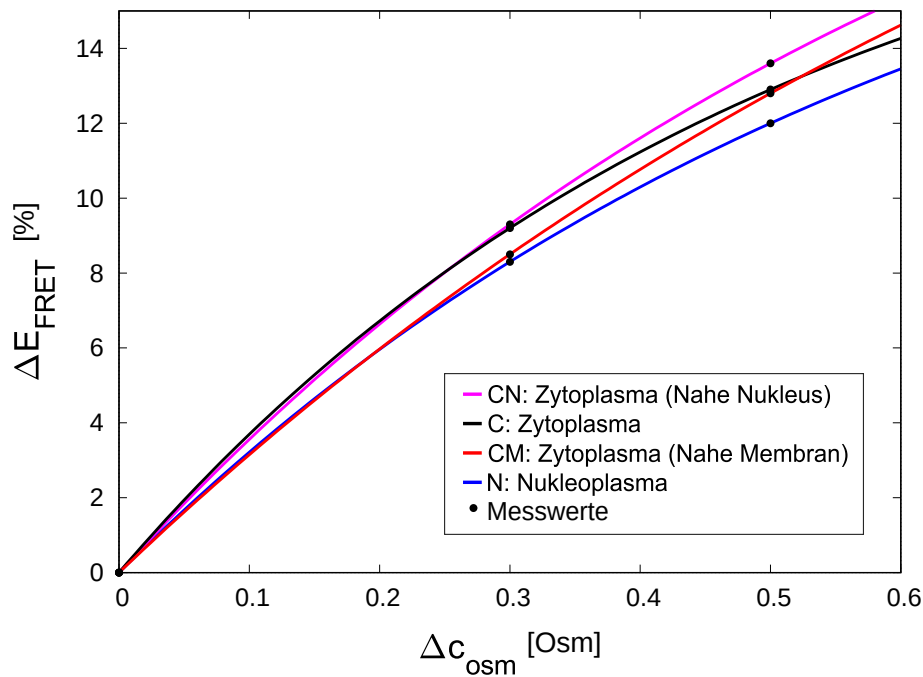


Abbildung 6.5.: FRET-Differenzen in Abhängigkeit der Osmolaritätsdifferenzen - Modellbildung. Gezeigt sind die FRET-Effizienz-Unterschiede ΔE_{FRET} bei den untersuchten Osmolaritätsdifferenzen Δc_{osm} an den Messorten, N, CN, C und CM. Für die Abhängigkeit zwischen ΔE_{FRET} und Δc_{osm} wird ein exponentielles Modell vorgeschlagen. Die durchgezogenen Linien sind die Modellvorschläge für die einzelnen Messorte, die schwarzen Punkte die Messwerte. Bei diesem Modellvorschlag handelt es sich um eine rein phänomenologische Beschreibung der vorliegenden Daten, die sowohl die zwingend saturierende Eigenschaft eines möglichen Verlaufs als auch den Grenzfall keiner FRET-Effizienzzunahme ohne Osmolaritätszunahme erfüllt.

6.3. Diskussion

Kernaussagen

Der *Crowding*-Sensor fCrH2 reagiert auf die Volumenreduktion der HeLa-Zellen sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleoplasma mit einer Zunahme der FRET-Effizienz. Signifikante Unterschiede konnten in manchen Fällen auch regionsübergreifend sowohl vor als auch nach der Behandlung mit hyperosmotischem Mikroskopiemedium aufgedeckt werden. Der Sensor zeigt eine geringe intrazelluläre, aber eine signifikante osmolaritätsspezifische Reaktion. Die exponentielle Abhängigkeit der FRET-Effizienzdifferenzen und der Osmolaritätsdifferenzen muss durch weitere Experimente geprüft werden.

FRET-Effizienzen wurden an zwei wohldefinierten Orten, im Zytoplasma (C) und im Nukleoplasma (N), sowie an zwei weiteren Orten im Zytoplasma, nahe dem Zellkern (CN) und nahe der Zellmembran (CM) gemessen. Dabei ist der Messort nahe am Zellkern (CN) ungenau, da der Nukleus zum Teil vom rauen ER und vom Golgi-Apparat umgeben wird und damit einzelne Messungen in diesen Bereich stattgefunden haben können. Da sich weder der Golgi-Apparat noch das ER in den Fluoreszenzbildern mit transfiziertem fCrH2 vom Zytoplasma abhebt, wird dieser Messort im Rahmen des genannten Fehlereinflusses diskutiert.

Die jeweiligen Messorte (N, CN, C, CM) werden untereinander im isoosmotischen und hyperosmotischen Zustand verglichen, um die lokale Spezifität von fCrH2 auf Gedrängtheitsunterschiede zu prüfen. Darüber hinaus wird sowohl die lokale Reaktion von fCrH2 auf Osmolaritätsunterschiede als auch die lokal unterschiedliche Reaktion dieser diskutiert. Zuletzt wird die Abhängigkeit der FRET-Effizienz und damit der Gedrängtheit von den Osmolaritätsunterschieden an den Messorten und ein mögliches Modell dafür diskutiert. Als Signifikanztest wurde der Wilcoxon-Ranksum-Test verwendet, da dieser den Median der Verteilungen prüft, damit robust gegenüber stark streuenden Werten und besonders für kleine Stichprobengrößen geeignet ist.

6.3.1. Intrazelluläre Unterschiede der Gedrängtheit

In Tab. 6.1 wurde beobachtet, dass sich bei allen geprüften Signifikanzniveaus die Gebiete im Zytoplasma, (C), (CN) und (CM) bezüglich der gemessenen FRET-Effizienz und dem Verhältnis FRET-aktiver Moleküle nicht unterscheiden. Man kann also argumentativ alle untersuchten Regionen des Zytoplasmas zu (Z) zusammenfassen. Daraus folgt, dass lediglich die zytoplasmische Region (Z) mit dem Nukleoplasma (N) verglichen werden muss. Es wird angenommen, dass C, CN, und CM zu derselben Grundgesamtheit gezählt werden können und die zugehörigen Signifikanzniveaus mit

der ODER-Funktion verknüpft oder gemittelt werden können, um zwei mögliche Betrachtungsarten zu nennen. Im Falle der ODER-Verknüpfung kann man das höchste Signifikanzniveau, also die geringste Relevanz, als Abschätzung verwenden. Diese Betrachtung wird in Tab. 6.4 vorgestellt.

W-RS TEST $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$	τ^U	τ^T	λ^T	W-RS TEST $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$	τ^U	τ^T	λ^T
N-Z (α_{max})	Y	Y	Y	N-Z (α_{max})	Y	-	Y
N-Z (α_{av})	0.04	0.04	0.05	N-Z (α_{av})	0.1	-	0.05

Tabelle 6.4.: Zusammengefasste regionsübergreifende Unterschiede der Donor-Akzeptor-Lebenszeiten τ_{DA} und Fraktionen λ_{DA} von fCrH2 - Wilcoxon-Ranksum-Test. Gezeigt werden die zusammenfassenden Betrachtungsarten α_{max} und α_{av} der Donor-Akzeptor Lebenszeiten τ_{DA} und Fraktionen λ_{DA} zwischen Nukleus (N) und Zytoplasma (Z): **N-Z**(α_{max}) und **N-Z**(α_{av}) vor der Behandlung (Superskript U) sowie nach hyperosmotischer Behandlung (Superskript T). Farbkodiert: $\alpha = 0.05$, $\alpha = 0.1$. Die Donor-Akzeptor-Lebenszeit τ_{DA} ist hier durch $\tau_{\text{DA}} =: \tau$, die Donor-Akzeptor-Fraktion λ_{DA} durch $\lambda_{\text{DA}} =: \lambda$ abgekürzt. Die Donor-Akzeptor-Fraktion λ_{DA} von fCrH2 in isoosmotischen HeLa-Zellen ist hier nicht gezeigt. α_{max} : Verknüpft man in Tab. 6.1 alle Signifikanzniveaus, die den Nukleus als Bezugsgröße haben: (N-CN), (N-C), (N-CM) mit der ODER-Funktion und fordert zusätzlich, dass alle signifikanten Unterschiede zwischen τ^U, T und λ^T bei demselben α signifikant sind, erhält man α_{max} . Damit ist die ODER-Verknüpfung und das Resultat α_{max} eine Abschätzung der Signifikanz nach unten. α_{av} : Mittelt man in Tab. 6.1 alle Signifikanzniveaus, die den Nukleus als Bezugsgröße haben: (N-CN), (N-C), (N-CM) erhält man α_{av} . Sowohl α_{max} als auch α_{av} zeigen die starke Schwankung der Zellen untereinander. Theoretisch sollten τ_N^U im Nukleus und τ_Z^U im Zytoplasma in gleichem Maß unterschiedlich oder gleich sein. Es zeigt sich aber, dass ohne hyperosmotische Behandlung eine Unterscheidbarkeit zwischen Nukleus und Zytoplasma bezüglich τ^U bei den Messungen mit $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ bereits bei $\alpha_{\text{av}} = 0.04$ gegeben ist, bei den Messungen mit $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$ jedoch erst ab $\alpha_{\text{av}} = 0.1$. Nach der hyperosmotischen Behandlung mit $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ ist der Unterschied der Donor-Akzeptor-Lebenszeit τ^T zwischen Nukleus und Zytoplasma bei $\alpha_{\text{av}} = 0.04$. Nach der hyperosmotischen Behandlung mit $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$ ist kein Unterschied der Donor-Akzeptor-Lebenszeit zwischen Nukleus und Zytoplasma bei $\alpha = 0.1$ feststellbar.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss man berücksichtigen, dass lebende Zellen sich ständig verändernde Organismen sind, deren Zustand individuell vom Zellzyklus abhängt. Über die Selektion durch das Auge lassen sich zwar Interphasezellen von Mitosezellen unterscheiden, man weiß jedoch nicht in welchem Stadium der Interphase sie sich befinden. Diese Unsicherheit führt zwangsläufig zu teilweise großen Unterschieden im Expressionslevel intrazellulärer Proteine wie auch des Sensors selbst. Dieser Effekt ist in Tab. 6.1 zu sehen, wo sich die Donor-Akzeptor Lebenszeiten τ_{DA} ohne Behandlung bei $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ unterscheiden, bei $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$ jedoch nicht. Darüber hinaus werden durch hyperosmotischen Stress Regulationsmechanismen in Kraft gesetzt, die bereits während der Messung wirken. Hefezellen bekämpfen hyperosmotischen Stress beispielsweise über die Produktion von Glycerin, um die Osmolarität des Zytoplasmas zu erhöhen und damit den Konzentrationsunterschied osmotisch aktiver Teilchen innerhalb und außerhalb der Zelle anzugleichen^{[169] [170]}. Ein ähnlicher Mechanismus könnte in HeLa-Zellen ebenfalls dazu beitragen, dass die Ergebnisse verfälscht werden und der geforderte stationäre Zustand der Zellen nicht erreicht wird oder von Zelle zu Zelle schwankt.

Den Gedrängtheitsunterschied zwischen dem zytoplasmischen Bereich und dem Nukleoplasma könnte die Kondensation der DNA^[171] im Nukleoplasma erklären. Die DNA liegt bereits im physiologischen Zellzustand kompaktifiziert im Nukleus vor^[172]. Die Kondensation der DNA wurde bereits in *E. Coli* Bakterien von Zimmerman et al.^[173] untersucht. Ihre Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Kondensation nicht nur den Zweck hat, das durch die Polymere eingenommene Volumen zu verringern, sondern weiterhin eine Schutzfunktion gegenüber äußeren Einflüssen darstellt, die besonders beim Erbgut sinnvoll ist. Die Kondensation der DNA hat zugleich die Volumenreduktion und damit den Rückgang des ausgeschlossenen Volumens^[67] (*excluded volume*) zur Folge, was wiederum das *Crowding* und damit die FRET-Effizienz verringert.

Weiterhin fällt in Tab. 6.4 auf, dass die Fraktionen FRET-aktiver Moleküle im Nukleus und Zytoplasma in allen Stressszenarien intrazellulär unterschiedlich sind, während sich die FRET-Effizienzen im Fall von $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$ bis zu einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0.1$ nicht ändern. Die FRET-Effizienz trifft in diesem Zusammenhang eine Aussage über die mittlere Nähe der Donor- und Akzeptormoleküle, während die Fraktion der FRET-Aktivität bestimmt, wie viele Moleküle an der Statistik beteiligt sind. Deshalb sind diese beiden Größen nicht zwingend in gleichem Maße proportional.

6.3.2. Lokale Auswirkung der Osmolaritätsunterschiede

An allen untersuchten Messorten konnte ein signifikanter Unterschied der FRET-Effizienzen in Abhängigkeit der Osmolarität gemessen werden. Unter beiden Stresskonditionen $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ und $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$ konnte am Messort nahe am Nukleus (CN) die höchste und im Nukleoplasma (N) die geringste Zunahme der FRET-Effizienz gemessen werden. Obwohl die Unterschiede im zytoplasmischen Bereich statistisch bis zu einem Signifikanzniveau $\alpha = 0.1$ nicht wesentlich sind, sollen im Folgenden die Tendenzen der FRET-Effizienzunterschiede in Abb. 6.4 im Hinblick auf mögliche Ursachen diskutiert werden.

Im letzten Abschnitt wurde der Unterschied der Gedrängtheit zwischen der zytoplasmischen Region und dem Nukleoplasma sowohl im isoosmotischen als auch in den hyperosmotischen Zuständen durch die Kondensation der DNA erklärt. Eine zunehmende Kondensation der DNA unter stärkerer Volumenreduktion des Zellkerns^[174] könnte daher auch erklären, warum die Gedrängtheitszunahme im Nukleoplasma unter hyperosmotischem Stress sowohl bei $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ als auch $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$ im Vergleich zu allen anderen Messorten am geringsten ist. Die zunehmende Kompaktifizierung könnte damit eine zelluläre Schutzfunktion darstellen, die bei zunehmendem hyperosmotischen Stress aktiviert wird.

Um die behandlungsübergreifend größte Zunahme der FRET-Effizienzen ΔE_{FRET} am Messort nahe des Zellkerns zu erklären, wird die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die Messungen zum Teil im Golgi-Apparat oder dem rauen ER durchgeführt wurden.

Weiss et al.^[175] haben mit Hilfe von FCS-Messungen nachgewiesen, dass bestimmte Proteine im Golgi-Apparat anomale Diffusion zeigen und dass dieser Effekt eher von der Proteinsorte selbst als von der Topologie der Organelle abhängt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die bei beiden Stresskonditionen $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ und $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$ nahe am Zellkern gemessenen FRET-Effizienzen auf die Topologie oder die Gedrängtheit im Inneren dieser Organellen zurückzuführen sind. Es wird vermutet, dass die Zunahme der FRET-Effizienzen an diesem Messort mit der Kompression der Zisternenstruktur des Golgi-Apparates^{[176][177]} oder des ER zusammenhängen. Diese Kompression würde das ausgeschlossene Volumen ebenfalls erhöhen und damit den FRET-Effekt begünstigen.

Die Mittelwerte der FRET-Effizienzunterschiede an den Messorten im Zytoplasma (C) und nahe der äußeren Zellmembran (CM) liegen sowohl bei $\Delta c_{\text{osm}} = 0.3 \text{ Osm}$ als auch bei $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$ zwischen den Messorten im Nukleoplasma und nahe des Zellkerns und sind bei $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$ nicht unterscheidbar. Daher wird gefolgert, dass die zytoplasmische Gedrängtheit an beiden Messorten dieselbe ist.

6.3.3. Zusammenhang der Osmolarität und der FRET-Effizienz

Die lineare Abhängigkeit der Zellhöhe und damit des Zellvolumens von der Osmolarität wurde bereits von Sukenik et al.^[157] im Bereich der Osmolaritäten $0.1 \text{ Osm} - 0.8 \text{ Osm}$ nachgewiesen. Sie fanden, dass die Zellhöhe mit zunehmender Osmolarität geringer wird, während die Adhäsionsfläche der Zellen an der Probenkammer annähernd gleich bleibt.

Für den Verlauf der FRET-Effizienzzunahme in Abhängigkeit von der Osmolaritätszunahme wurde ein exponentielles Modell vorgeschlagen, das beide Größen miteinander verknüpft. Das Positivresultat des Modells ist, dass es keine unrealistischen Grenzfälle der FRET-Effizienzzunahme bei sehr hohen Osmolaritätsunterschieden voraussagt. Die höchste nach dem Modell erreichbare FRET-Effizienz liegt bei $E_{\text{FRET}} \approx 60 \%$. Dieser Absolutwert kann je nach Genauigkeit der Donor-Lebenszeit τ_D schwanken, die Größenordnung ist aber realistisch. Das Negativresultat ist, dass an zwei benachbarten Messorten, C und CM, der höchste Unterschied der Effizienzzunahmen bei maximaler Osmolaritätszunahme vorhergesagt wird, was unrealistisch ist, da beide Messorte im Zytoplasma sind.

Ob sich der Verlauf der FRET-Effizienzzunahme bei weiteren Osmolaritätsunterschieden gemäß des Modelles Gl. (6.8) verhält, bleibt zu prüfen. Da sowohl die Ensemblegröße der gemessenen Zellen N_{cell} als auch die der verschiedenen Osmolaritäten c_{osm} gering ist, kann an dieser Stelle keine eindeutige Aussage getroffen werden. Das vorgeschlagene Modell ist nur für die hyperosmotische Stressbehandlung zu verwenden. Für hypoosmotische Stressunterschiede $\Delta c_{\text{osm}} < 0$ muss beachtet werden, dass bei übermäßiger Wasseraufnahme die Zellmembran den osmotischen Druck nicht mehr standhalten und die Zelle aufplatzen kann.

Teil III.

Invertierte Lichtblattmikroskopie und Rauschanalyse: Konzept eines neuen Mikroskops

Motivation und Zielsetzung

Ziel dieses Projektes ist, einen optischen Messaufbau zu konzeptionieren und umzusetzen, der sowohl die Fluoreszenzbildgebung als auch die Rauschanalyse an alternierenden Messorten ermöglicht, wobei letztere den Weg zu prominenten Messmethoden der Biophysik wie FCS^[178] und PCF^{[179][180][18]} öffnet. FCS ist eine seit vielen Jahren mit großem Erfolg eingesetzte Einpunktmessmethode zur lokal begrenzten Transportquantifizierung. PCF dagegen ist eine Messmethode, die über die Art und Geschwindigkeit intrazellulärer Kommunikation zwischen zwei beugungsbegrenzten Volumina in der Probe Aufschluss gibt. Diese Kommunikation kann durch zelluläre Strömungen oder durch normale und anomale Diffusion zustandekommen. Abgrenzende Topologien wie intrazelluläre Membranen können für diese Prozesse dagegen eine Barriere darstellen^[179]. Im einfachsten Fall unterscheidet PCF über die Richtungssensitivität der Korrelationsfunktion zwischen diesen Alternativen, auch ohne quantitative Aussagen über Kommunikation oder Nichtkommunikation zu treffen. Eine der ersten motivierenden Publikationen von Gratton et al.^[39] zur Messmethode PCF befasst sich mit der Permeabilitätsuntersuchung der Zellkernmembran und der direkten Messung des Proteintransportes durch die Kernporen.

Die Etablierung der Messmethode PCF für den Lehrstuhl ist angelehnt an die Diplomarbeit „Korrelationsfunktionen zur Messung von Transportkoeffizienten in Simulation und Experiment“ - Andreas Veres - Universität Bayreuth - 2012 in der unter anderem versucht wurde, auf einem kommerziellen LSM, dem Leica-TCS-SP5, die PCF-Messmethode zu realisieren, um räumliche Transportprozesse über die implementierte lineare Abtastvorrichtung (*linescan*) messen zu können. Die Etablierung dieser Methode am LSM gelang aufgrund des prinzipiell niedrigen Signals der Messmethode in Kombination mit der ineffizienten Implementierung der Linienabtastung im Mikroskop nicht. Der Grund war, dass die spiegelgesteuerte Linienabtastung höchstens mit einer Frequenz von $f_{\text{scan}} = 1400 \text{ Hz}$ über eine geringste Distanz von $4 \mu\text{m}$ gesteuert werden konnte, während etwa 70 % der Messzeit für Beschleunigungs- bzw. Abbremsphasen der Galvanometer verwendet werden musste. Bei Kontrollexperimenten in verschiedenen Fluorophorlösungen wurden diese Verlustzeiten durch sehr lange Messzeiten ausgeglichen. Da dies jedoch in lebenden Zellen nicht möglich ist, musste eine zeiteffiziente Umsetzung der Strahlablenkung gefunden werden, die das Messen an definierten Orten

erlaubt.

Alle bisherigen Eigenentwicklungen verschiedener Forschungsgruppen, die Zweipunktmessungen erlauben und damit räumliche Kommunikation in zellulären Fluiden über PCF aufdecken könnten, verfügen über fest eingestellte Messdistanzen. Diese Limitierung erlaubt es beispielsweise nicht, den Anomalieparameter der Diffusion α_a über PCF zu messen. Darüber hinaus wird die feste Messdistanz dem niedrigen SNR der Messmethode nicht gerecht, die eine individuelle Distanzeinstellung auf den kleinstmöglichen Messabstand erfordert. Kommerzielle Mikroskope, die eine PCF-Messung ermöglichen, sind nicht erhältlich. Die bekanntesten, von verschiedenen Forschungsgruppen entwickelten, fluoreszenzspektroskopischen, Realisierungen der PCF-Methode werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Die simultane Zweipunktmessung mit Hilfe eines Nomarski-DIC (*differential interference contrast*)-Prismas und polarisierter Anregung und Detektion wurde bereits von Dertinger et al.^[181] zur Messung absoluter Diffusionskonstanten realisiert. Bei dieser Methode werden die bei der Anregung der Probe nach Polarisationsrichtung räumlich separierten Foki bei der Detektion wieder zusammengeführt. Dabei ist jedoch der Abstand der erzeugten Foki in der Probe durch das Prisma selbst vorgegeben und nur durch Bauteilwechsel und Nachjustage veränderbar. Dittrich et al.^[182] entwickelte des Weiteren einen Zweipunktmessaufbau, bei dem der Abstand der Foki im Anregungspfad variabel ist, jedoch durch die Einkopplung in eine zweigeteilte Detektorglasfaser wiederum festgelegt werden muss. Eine weitere bekannte Realisierung der Mehrpunktmessung ist Digman et al. über die kreisförmige Abtastung (*orbital scanning*) gelungen, über die Verlustzeiten der Spiegelbeschleunigungsphasen umgangen werden^[180]. In diesem Fall ist die Messdistanz entlang des Orbits definiert und damit frei. Die Steuerung der Abtastung wird aber über Galvanometer gelenkt und ist damit ineffizient.

Das Aufdecken intrazellulärer Transportwege ist für die Biophysik von höchstem Interesse und PCF öffnet hierfür den Weg. Die PCF-Methode ermöglicht dem Experimentator beispielsweise die Quantifizierung der Stresspropagation in zellulären Fluiden nach äußeren Störungen. Die Methode erlaubt es auch, auf einfache Weise durch zellulären Stress hervorgerufene Strömungen von der brownischen Molekularbewegung zu unterscheiden. Diese Möglichkeiten heben die PCF-Methode von lokal begrenzten spektroskopischen Verfahren ab und verdeutlichen die Wichtigkeit der Umsetzung im biophysikalischen Forschungsfeld.

Dieser Teil der Arbeit befasst sich mit der Konzeption eines Mikroskops, das über eine AOD (*acousto optical deflector*)-gesteuerte Strahlablenkung schnelle Fluoreszenzmessungen an räumlich alternierenden Orten erlaubt. Die räumlich aufgelösten Zeitreihen der Fluoreszenz können anschließend über Korrelationsfunktionen analysiert werden. Zusätzlich ist der Experimentator in der Lage, über die Lichtblattbeleuchtung der Probe beugungsbegrenzte Weitfeldfluoreszenzaufnahmen zu erstellen. In Abb. 6.6 wird die Idee des Mikroskops skizziert.

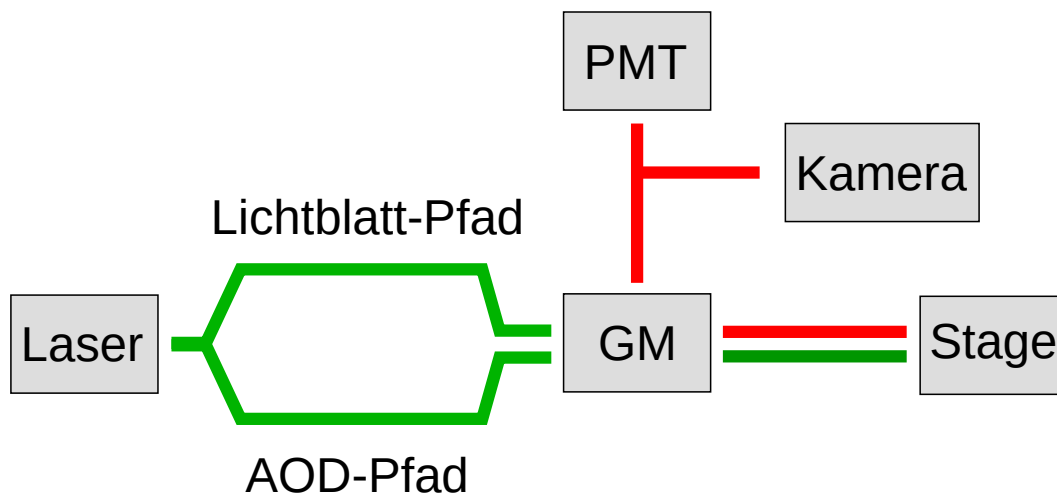


Abbildung 6.6.: Mikroskop-Konzeptskizze. Gezeigt ist der vereinfachte Aufbau des Mikroskops. Die Strahlwege sind farblich nach Anregung (**grün**) und Detektion (**rot**) gekennzeichnet. Die Beleuchtungsquelle ist ein **Laser**. Der Beleuchtungsstrahl nimmt entweder den **AOD-Pfad** oder den **Lichtblatt-Pfad** über den Galvanometer **GM** zur Probe auf dem Mikroskopietisch (**Stage**). Die Detektion führt von der Stage über den Galvanometer entweder auf die **Kamera** oder den Photomultiplier [**PMT**]. Die Beleuchtungs- und Detektionspfade können durch elektronisch gesteuerte Spiegel gewählt werden. Von den vier möglichen Kombinationen der Anregung und Detektion: **a)** AOD → PMT, **b)** AOD → Kamera, **c)** Lichtblatt → Kamera und **d)** Lichtblatt → PMT sind die ersten drei sinnvoll nutzbar. **a)** Fluoreszenz-Korrelationsanwendungen: FCS, PCF, RICS. **b), c)** fluoreszenzmikroskopische Bildgebung (*imaging*), höchstauflösende Fluoreszenzbildgebung SOFI.

Idee und Umsetzung

Zwei Mikroskoptypen werden vereinigt, um den Ansprüchen der Weitfeldfluoreszenzmikroskopie wie auch der Mehrpunktmessung gerecht zu werden. Kombiniert wird ein Lichtblattmikroskop, bei dem die Beleuchtung antiparallel zur Detektion erfolgt [Kapitel 7.1] und ein Einfokusbildmikroskop, das entweder an einem festen Ort oder schnell alternierend an mehreren verschiedenen Orten entlang einer Dimension Fluoreszenzmessungen ermöglicht [Kapitel 7.2]. Sämtliche Mikroskopkomponenten, die in den folgenden Unterkapiteln erwähnt werden, sind in Appendix V nach Firmen und Positionen mit Bezug zum Detailplan des Mikroskops [Abb. 7.3] aufgeführt.

7.1. Weitfeldfluoreszenzmikroskopie

Das Konzept der Lichtblattmikroskopie ist sehr populär und geht auf Zsigmondy et al.^{[13][183]} zurück. Das wesentliche Prinzip bei der Lichtblattmikroskopie [SPIM] ist, dass die Detektion der Fluoreszenz senkrecht zur Beleuchtungsrichtung erfolgt, womit die Tiefendiskriminierung in der Probe durch die Lichtblattdicke definiert ist. Das Prinzip der Tiefendiskriminierung durch eine Lochblende wurde in Kapitel 1.3.2 vorgestellt. Bei dem hier vorgestellten Mikroskop handelt es sich jedoch nicht um ein SPIM, da die Detektion invertiert ist, sie erfolgt antiparallel zur Beleuchtungsrichtung. Das Prinzip dieser Beleuchtungs- und Detektionsmethode ist in Abb. 7.1 gezeigt.

Durch diese Lichtblattbeleuchtung ergibt sich die Möglichkeit einen lateralen Schnitt der Probe simultan auszulesen, das Lichtblatt zu verschieben, wieder einen Schnitt auszulesen und dieserart die Probe abzurastern (*scanning*). Da dabei konstruktionsbedingt immer derselbe Bereich des Kamerasensors beleuchtet wird, ist der messbare Ausschnitt in der Probe nur in einer Dimension durch die Größe des Kamerasensors limitiert. Als Vorlage für diese Mikroskopiertechnik dient die Publikation von Lee et al.^[184], mit dem Unterschied, dass dort sowohl der Beleuchtungspfad als auch der Detektionspfad getrennt über Galvanometer gelenkt wird. Auf diese Art werden zwar hohe Bildwiederholraten (*frame-rate*) erreicht, durch die Größe des Kamerasensors können aber nur kleine Ausschnitte der Probe beobachtet werden.

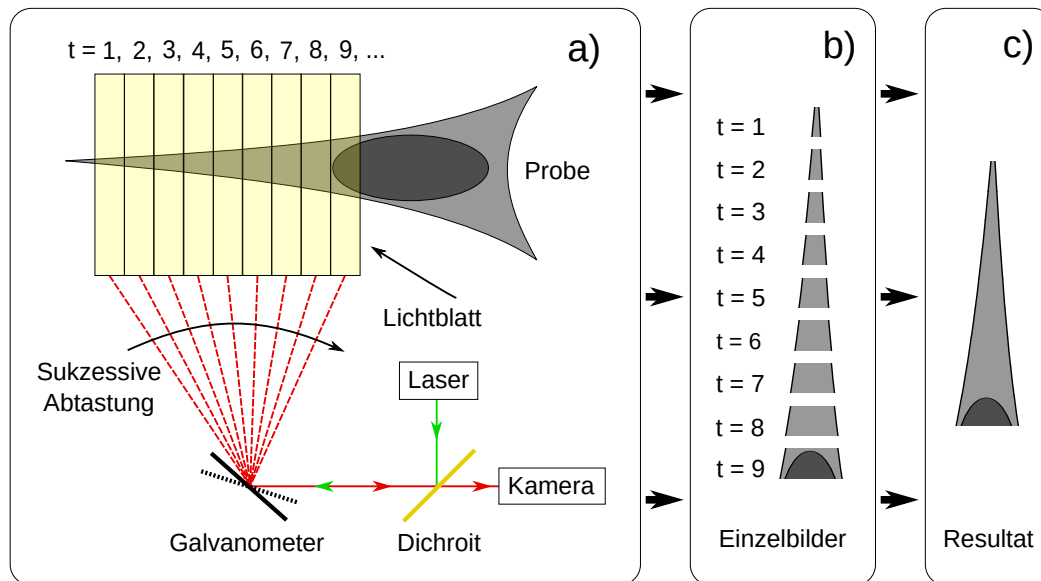


Abbildung 7.1.: Prinzip der invertierten Weitfeldfluoreszenzmikroskopie. Gezeigt ist die streifenweise Beleuchtung und Detektion der Probe. **a:)** Der Laserstrahl wird über den Dichroiten und den Galvanometer auf die Probe gelenkt. Die angeregte Fluoreszenz nimmt bis zum Dichroiten den rückwärtigen Weg und wird auf die Kamera abgebildet. In jedem Zeitschritt $t = 1, 2, 3, \dots$ wird ein Streifen des Fluoreszenzbildes aufgenommen. Die Belichtungszeit der Kamera wird dabei mit der Bewegung des Galvanometers synchronisiert. Nach der Aufnahme aller Bildstreifen (**b**)) können diese manuell zum Gesamtbild (**c**)) zusammengesetzt werden. Die experimentelle Umsetzung der streifenweisen Abtastung der Probe wird durch Lichtblätter realisiert. Das Wesentliche an dieser Aufnahmemethode ist, dass jedes beleuchtete Lichtblatt auf denselben Bereich des Kamerasensors abgebildet wird. Dadurch ist der messbare Ausschnitt der Probe nur in einer Dimension durch das Lichtblatt und die Größe des Kamerasensors limitiert.

7.2. Transport- und Kommunikationsmessung

Die Transportquantifizierung über FCS^[178] nutzt die Rauschanalyse einer Fluoreszenzzeitreihe durch Korrelationsfunktionen. Wird die Intensität einer fluoreszenten Probe mit hoher Zeitauflösung an einem festen Ort gemessen, erzeugt jedes Teilchen, das in das Beleuchtungsvolumen diffundiert, einen Anstieg der detektierten Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Laborzeit. Genauso sinkt die Fluoreszenz an jenem Ort, sobald ein Teilchen das Beleuchtungsvolumen verlässt. Durch diese Messung erhält man eine Fluoreszenzzeitreihe, die die Fluktuation der Fluoreszenzintensität enthält. Die Zeitskala, auf der diese Fluktuation stattfindet, hängt von der Diffusionskonstante des untersuchten fluoreszenten Proteins und der Ausdehnung des Beleuchtungsvolumens ab. Untersucht man die Fluoreszenzzeitreihe mit Hilfe von ACF, lässt sich die charakteristische Zeitskala auf der Teilchen das Beleuchtungsvolumen betreten und verlassen quantifizieren. Diese Zeit ist die mittlere Aufenthaltsdauer der Teilchen im Beleuchtungsvolumen und wird Diffusionszeit τ_{diff} genannt.

Erweitert man die beschriebene Einpunktmessung auf zwei räumlich getrennte Orte, Fokus 1 und Fokus 2, erhält man zwei verschiedene Fluoreszenzzeitreihen, eine je Mes-

sort. Beide Fluoreszenzzeitreihen enthalten die Information über die lokale Transportgeschwindigkeit und lassen sich getrennt mit Hilfe der ACF untersuchen. Die Methode PCF bietet hier zusätzlich die Möglichkeit, die Zeitskala, auf der ein bestimmtes Teilchen Fokus 1 verlässt und Fokus 2 betritt, oder Fokus 2 verlässt und Fokus 1 betritt, zu bestimmen. Während bei ACF eine Fluoreszenzzeitreihe mit sich selbst verglichen wird, untersucht PCF die Gemeinsamkeiten zweier Zeitreihen. Mit Hilfe der PCF-Methode lässt sich damit die Kommunikationsgeschwindigkeit der Messorte, Fokus 1 und Fokus 2, bezogen auf eine fluoreszente Proteinsorte quantifizieren. Das Prinzip von Zweipunktmessungen und deren Auswertung über PCF ist in Abb. 7.2 gezeigt.

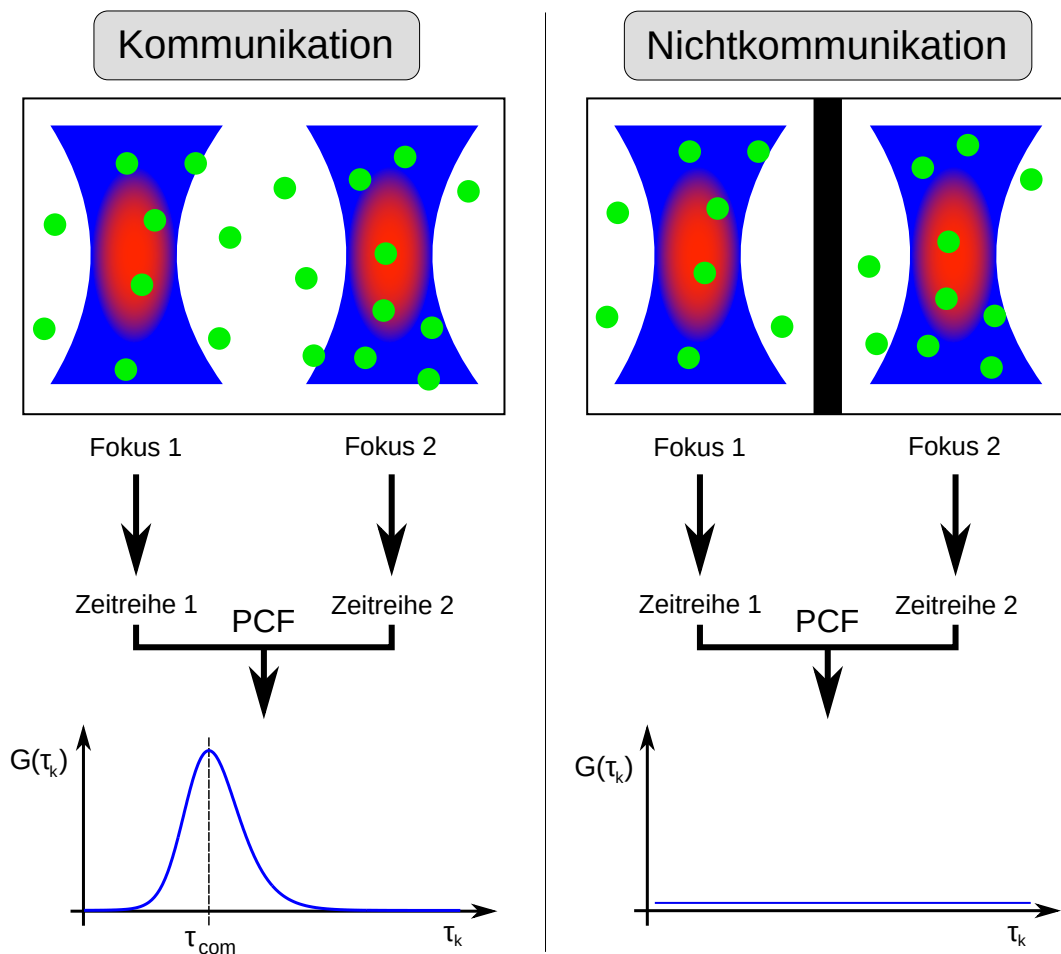


Abbildung 7.2.: Prinzip der Kommunikationsmessung durch PCF. Gezeigt ist die Messung der Transportgeschwindigkeit fluoreszenter Teilchen zwischen den beiden Messorten Fokus 1 und Fokus 2 in einem abgeschlossenen System wie dem Zytoplasma und das Ergebnis der PCF-Auswertung $G(\tau_k)$. Ein akustooptischer Deflektor beleuchtet abwechselnd die Messorte 1 und 2. Die Beleuchtungsfoki sind blau-rot und fluoreszente Teilchen durch grüne Punkte angedeutet. Die Kommunikationsgeschwindigkeit zwischen den beiden Messorten wird über die Transitzeit τ_{com} quantifiziert. **Kommunikation:** Die Teilchen können sich frei zwischen den beiden Foki bewegen, die Transitzeit zwischen den Foki ist durch τ_{com} gegeben. **Nichtkommunikation:** Eine Barriere verhindert, dass dieselben Teilchen sowohl vom Fokus 1 als auch vom Fokus 2 erfasst werden. Die PCF zeigt das Vorhandensein der Barriere durch $G(\tau_k) = 0$ im gesamten Zeitbereich τ_k .

Die Zweipunktmessung wird bei diesem Mikroskopaufbau durch schnelles Umschalten der Beleuchtungsfoki von einem Messort zum anderen mit Hilfe eines AOD umgesetzt.

7.3. Aufbau und Konstruktion des Mikroskops

Um der Anforderung der variablen Messdistanz und schneller Alternierung im Mehrfokusbetrieb gerecht zu werden, muss eine Strahlablenkungsmethode gefunden werden, die schneller ist als über Galvanometer erzielbare Werte (~ 1 ms). Hierfür stehen EOD (*electro optical deflector*) und AOD zur Wahl^[185]. Optoelektrische Systeme, die den Pockels-Effekt^[186] nutzen, sind zwar sehr Reaktionsschnell (≤ 1 μ s), haben aber kleine Ablenkwinkel (~ 1 μ rad), was den Strahlengang unnötig verlängert. Ein AOD bietet dagegen einen akzeptablen Kompromiss zwischen der Reaktionszeit und möglichen Ablenkungswinkeln. Die Entscheidung fällt deshalb auf ein akustooptisches System mit einer Schaltzeit $\tau_a \approx 5$ μ s und mittlerem Ablenkwinkel $\gamma_o \approx 20$ mrad.

Der Aufbau ist aufgeteilt in einen alternierenden Einpunkt-Messpfad, auch AOD-Pfad genannt, und einen Bildgebungs-Messpfad, auch Lichtblatt-Pfad genannt, die über elektronisch gesteuerte Spiegel innerhalb $T_{\text{switch}} = 1.5$ s gewechselt werden können. Es sind zwei senkrecht zueinander justierte Ablenkungssysteme implementiert, ein AOD und ein GM, die bei Synchronisation auch den Einsatz des Mikroskops als LSM ermöglichen.

Eine detaillierte Übersicht des Aufbaus mit den alternativen Beleuchtungs- und Detektionspfaden ist in Abb. 7.3 gezeigt. Die Strahlwege in den Anregungspfaden werden in Kapitel 7.5.2 beschrieben, die Strahlwege der Detektionspfade in Kapitel 7.5.3.

7.4. Komponenten

In den folgenden Unterkapiteln werden wichtige Parameter folgender Komponenten beschrieben: AOD, Laser, GM, Objektiv, Mikroskopietisch (X-Y-Stage), PMT und Kamera. Zunächst wird das Prinzip der Strahlablenkung über einen akustooptischen Deflektor erklärt und die Auswahl des Lasers als Beleuchtungsquelle begründet, da der AOD und der Laser bezüglich bestimmter Parameter miteinander kompatibel sein müssen. Als Nächstes folgt die elementare Funktionsweise eines Galvanometers. Diese Komponente wird ebenfalls für die Strahlablenkung genutzt, verfügt aber über keine Besonderheiten im Vergleich zu anderen GM. Das verwendete Leica-Objektiv wird vorgestellt, da die Beschreibung der Strahlführung Bezeichnungen verwendet, die an dieser Stelle definiert werden müssen. Erläuterungen zum Mikroskopietisch und den Detektionsmöglichkeiten der Fluoreszenz über PMT und Kamera schließen die Komponentenbeschreibung ab.

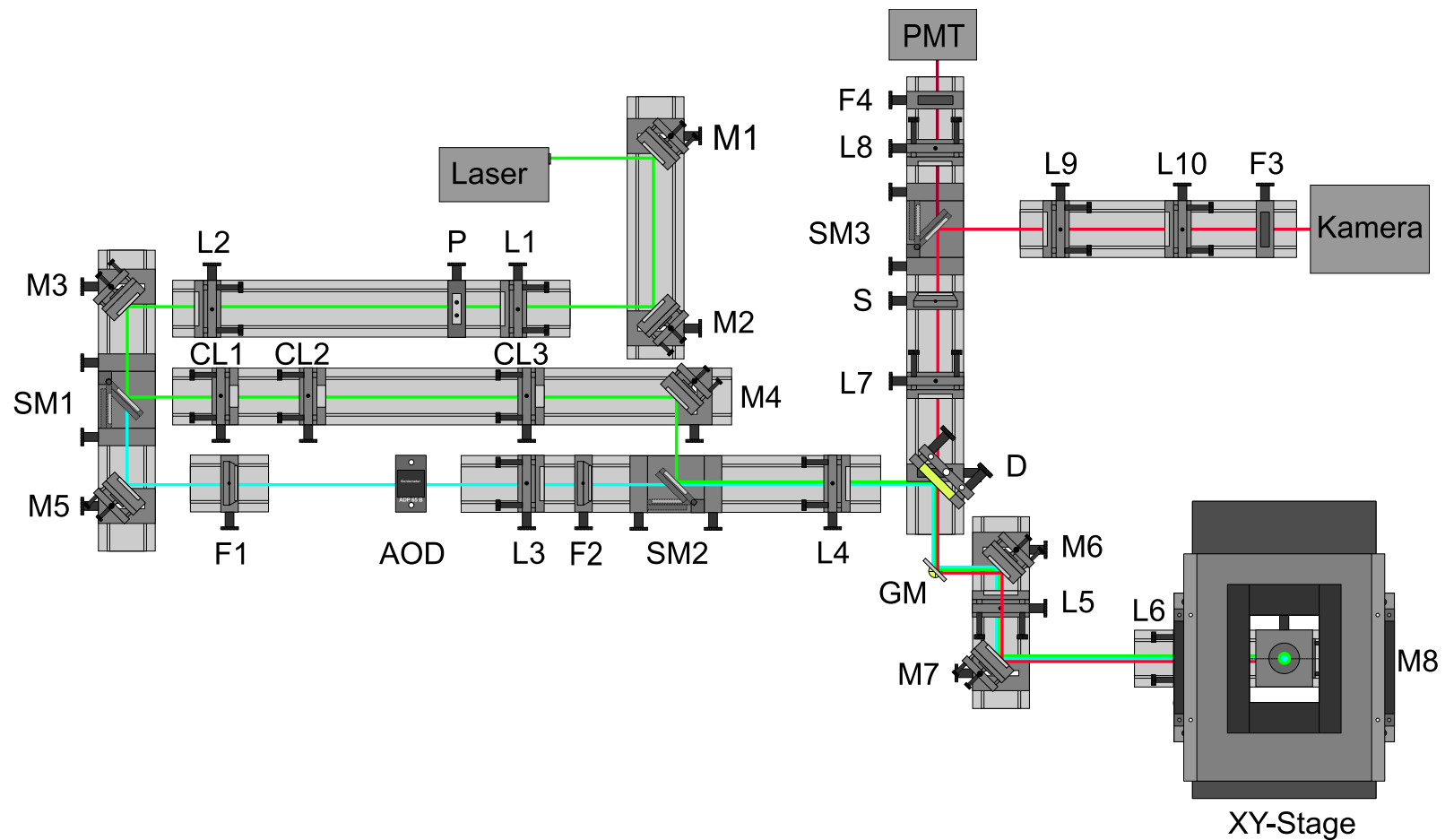


Abbildung 7.3.: Detailplan des Mikroskopaufbaus. **Laser:** Beleuchtungsquelle, **L:** Linsen, **M:** Spiegel, **P:** Lochblende (*pinhole*), **CL:** Zylinderlinse, **F:** Filter, **SM:** elektronisch gesteuerter Klappspiegel, **D:** dichroitischer Spiegel, **AOD:** akustooptischer Deflektor, **GM:** Galvanometer, **Kamera:** räumlich aufgelöste Detektion, **PMT:** einzelphotonensensitive Detektion, **XY-Stage:** Mikroskopietisch. Die Funktion der Bauteile bezüglich Strahlformung, Polarisation im Anregungs- und Detektionspfad etc. sind dem Fließtext zu entnehmen. Vergleiche auch Abb. 7.7 und Abb. 7.8, für die linearisiert dargestellte Strahlführung. Anregung: **AOD-Pfad (türkis)**, **Lichtblatt-Pfad (grün)**, **PMT-Detektion: (rot→bordeauxrot)**, **Lichtblatt-Detektion: (rot→rot)**. Die Abmessungen des Aufbaus sind 1.8 m × 1.2 m.

7.4.1. Akustooptischer Deflektor

Akustooptische Deflektoren sind für die Strahlablenkung im Bereich von $\gamma_o \approx 20$ mrad geeignet. Sie verfügen über hohe Reaktionszeiten im $\tau_a \approx 5 \mu\text{s}$ -Bereich und sind damit etwa $100\times$ schneller als Galvanometer^[185]. Darüber hinaus ist ihre Schaltzeit τ_a unabhängig vom Ablenkwinkel γ_o . Für den geplanten Aufbau wurde der AOD AA.DTSX-250-488-RS^[187] der Firma Pegasus-Optik gewählt. Das Funktionsprinzip dieses Ablenkungssystems beruht auf der longitudinalen periodischen Kompression eines optisch transparenten Kristalls (typischerweise TeO_2) und der damit einhergehenden Änderung des Brechungsindex. Diese Änderung im Brechungsindex des Kristalls führt dazu, dass der Laserstrahl in Abhängigkeit von der Modulationsfrequenz f_a unter verschiedenen Winkeln γ_o aus dem Kristall austritt.

$$\gamma_o = \frac{\lambda_{\text{ex}} \Delta f_a}{2n v_a}, \quad \tau_a = \frac{D_a}{v_a} \quad (7.1)$$

In Gl. (7.1) bezeichnet γ_o den Ablenkwinkel der ersten Ordnung, λ_{ex} die Vakuumwellenlänge des Lasers, Δf_a die Änderung der Frequenz der akustischen Welle, n den Brechungsindex des TeO_2 -Kristalls und v_a die akustische Ausbreitungsgeschwindigkeit im Kristall. Die Strahlablenkungszeit τ_a hängt von der AOD-Apertur D_a und der Schallgeschwindigkeit v_a ab. Die experimentell zugänglichen Parameter sind die eingekoppelte Schallfrequenz f_a sowie die Wellenlänge des Lasers λ_{ex} . Die eindimensionale Modulation des Kristalls hat zur Folge, dass durch den AOD nur eine Polarisationsrichtung abgelenkt werden kann, weshalb zusätzlich zur bestehenden Polarisation des Lasers [Kapitel 7.4.2] ein Polarisationsfilter direkt vor dem AOD zur Filterung nicht ablenkbarer Polarisationsrichtungen benötigt wird. Die Ablenkungseffizienz (*deflection efficiency*) ist bei einem AOD typischerweise im Bereich von $\sim 70\%$ und ist durch das Verhältnis der Intensität der ersten Ordnung zur Eingangsintensität definiert. Abb. 7.4 zeigt die Funktionsweise eines akustooptischen Deflektors. Der AOD sorgt bei diesem Aufbau für die Strahlablenkung in vertikaler Richtung zur Tischebene.

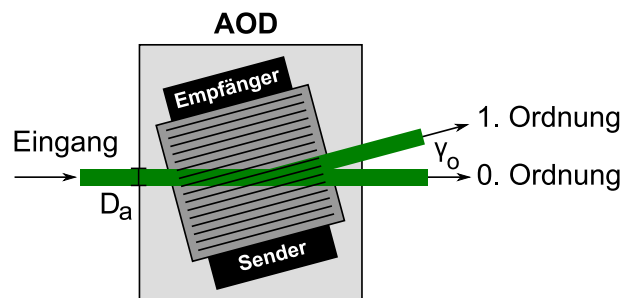


Abbildung 7.4.: Funktionsprinzip eines akustooptischen Deflektors (AOD). Der **Sender**, **Empfänger** und der dazwischen angebrachte TeO_2 -Kristall bilden eine Einheit und werden im Gehäuse des AOD in der Weise gekippt montiert, dass die **0. Ordnung** des Beleuchtungsstrahls (**Eingang**), parallel zur optischen Achse transmittiert wird. Die **1. Ordnung** bezeichnet den Anteil des eingekoppelten Laserstrahls, der um den Winkel γ_o abgelenkt werden kann. D_a : Aperturdurchmesser des AOD. Der **Sender** emittiert akustische Wellen der Frequenz f_a , die durch den TeO_2 -Kristall mit der Geschwindigkeit v_a propagieren und vom **Empfänger** absorbiert werden.

7.4.2. Laser

Es wurde ein Cobolt-Calypso^[188] cw (*continuous wave*)-Laser mit der Wellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 491 \text{ nm}$ und schmaler spektraler Breite $\Delta\lambda_{\text{ex}} \approx 0.8 \text{ fm}$ gewählt, da der AOD optimiert auf diese Wellenlänge arbeitet und benachbarte Wellenlängen verschieden stark abgelenkt werden (*dispersion*). Der Laser sendet bei vorgesehener Installation einen senkrecht zur Tischebene polarisierten Strahl aus.

Es wurde auch erwogen, einen gepulsten Laser zu verwenden. Dieser ist in Kombination mit dem AOD ohne weitere Dispersionskorrekturen allerdings ungeeignet, da ein Laserpuls verschiedene Fourierkomponenten und damit Wellenlängen enthält, die bei der Ablenkung des Strahls durch den AOD das Gaußprofil in Abhängigkeit von der Anstiegsdauer des Laserpulses deformieren können. Die Publikation von Ngoi et al.^[189] befasst sich mit Korrekturmöglichkeiten, die den Einsatz gepulster Laser für AOD-Strahlablenkungssysteme ermöglichen.

7.4.3. Galvanometer-Scanner

Galvanometer nutzen das Prinzip der elektromagnetischen Induktion und reagieren auf eine angelegte Spannung mit einer Spiegelrotation, die zur Strahlablenkung genutzt wird. Für die Strahlablenkung in der zur Tischebene horizontalen Ebene wurde der GM 6215HSM40^[190] der Firma Cambridge Technology verwendet. Der GM bildet mit dem AOD ein X-Y-Ablenkungssystem, mit dem das Mikroskop auch als LSM eingesetzt werden kann.

7.4.4. Objektiv

Als Objektiv wird ein HC PL APO CS 63 \times /1.2 CORR CS2^[191] von Leica Microsystems verwendet. Dies ist ein Wasserimmersionsobjektiv mit einer Vergrößerung von $M_{\text{Obj}} = 63$ und einer numerischen Apertur von $\text{NA} = 1.2$. Es ist für Abtastanwendungen (*scanning applications*) optimiert und chromatisch sowie sphärisch korrigiert. Dies bedeutet, dass die Arbeitsebene nicht gekrümmt ist und alle Fluoreszenzwellenlängen im Arbeitsabstand gleichermaßen parallelisiert werden. Umgekehrt werden auch unter beliebigen Einfallswinkeln auf die BFP (*back focal plane*) treffende Strahlen in dieselbe Ebene fokussiert. Abb. 7.5 zeigt ein Leica-Objektiv mit den Bezeichnungen und Maßen, die in der Strahlbeschreibung [Kapitel 7.5] verwendet werden.

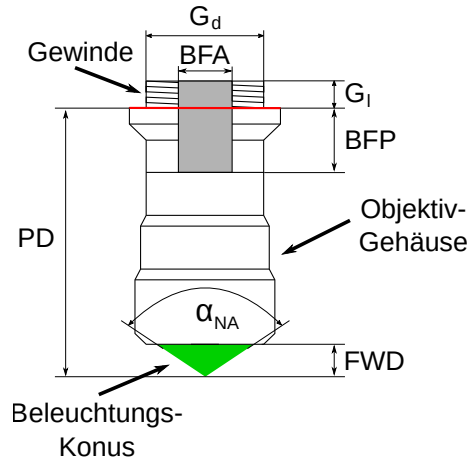


Abbildung 7.5.: Skizze eines Leica-Objektivs. Gezeigt ist der schematische Aufbau des verwendeten Leica Objektivs HC PL APO CS 63x/1.2 CORR CS2 mit den wesentlichen Maßen, die in den Kapiteln zur Strahlführung verwendet werden. Die Abmessungen wurden zum Teil der Objektiv-Broschüre^[191] entnommen, BFA wurde gemessen. **BFA**: hinterer Aperturdurchmesser (*back focal aperture*) $BFA = 9.5 \text{ mm}$, **BFP**: hintere Fokalebene (*back focal plane*) $BFP = 17.5 \text{ mm}$. Die hintere Fokalebene wird bezüglich des Gehäuseanschlages (**rot**), das mit dem Montagegewinde endet, angegeben. Die Gewindelänge des Montagegewindes (M25) ist $G_l = 5 \text{ mm}$, der Durchmesser ist $G_d = 25 \text{ mm}$. **FWD**: Arbeitsabstand (*free working distance*) $FWD = 0.3 \text{ mm}$. Der Beleuchtungskonus ist grün gezeigt. Die Spitze des Konus, in dem das fokale Volumen erzeugt wird, definiert mit dem Gehäuseanschlag den Parfokalabstand **PD** (*parfocal distance*) $PD = 45 \text{ mm}$. α_{NA} : maximaler Öffnungswinkel des Objektivs, definiert zusammen mit dem Brechungsindex n des Immersionsmediums die numerische Apertur $NA = n \sin(\alpha_{NA})$. Für das Leica Objektiv gilt $NA = 1.2$.

7.4.5. Mikroskopietisch

Der Mikroskopietisch bei diesem Aufbau besteht aus der X-Y-Stage MLS203-1^[192] mit dem Probenhalter MLS203-P2^[193] und der Steuerungseinheit BBD202-2^[194] der Firma Thorlabs. Der Mikroskopietisch wird über vier Säulen auf dem optischen Tisch befestigt. Der Strahl wird über den Spiegel M8 aus der optischen Achse ausgelenkt und vertikal von unten in das Objektiv justiert.

7.4.6. Photomultiplier

Für die Detektion der Fluoreszenz im AOD-Pfad wird der PMT H7421-40^[195] der Firma Hamamatsu verwendet. Dieser hat einen Detektionsbereich $\Delta\lambda_{\text{det}} = 300 - 720 \text{ nm}$ mit der maximalen Detektionseffizienz bei $\lambda_{\text{det}} = 580 \text{ nm}$. Der Sensordurchmesser beträgt $D_{\text{PMT}} = 5 \text{ mm}$. Die typische Dunkelzählrate (*dark count rate*) beträgt $R_{\text{dark}} = 100 \frac{\text{counts}}{\text{s}}$.

7.4.7. Kamera

Für die Detektion der Fluoreszenz im AOD- und Lichtblattpfad wird die Kamera DC-150Q-FI^[196] „Neo“ der Firma Andor-Technology verwendet. Es handelt sich um eine sCMOS-Kamera mit einem Detektionsbereich $\Delta\lambda_{\text{det}} = 400 - 800 \text{ nm}$ bei einer Detektionseffizienz $E_{\text{det}} > 30 \%$. Der Sensor hat, bezogen auf die optische Tischebene, die

Abmessungen $h_{\text{sensor}} = 16.6 \text{ mm}$ und $d_{\text{sensor}} = 14 \text{ mm}$. Dies entspricht der Pixelzahl $N_x \times N_y = 2160 \times 2560$ bei einer Pixelgröße von $p_s = 6.5 \mu\text{m}$. Die maximale Aufnahme rate beim Auslesen des gesamten Sensors beträgt $R_{\text{read}}^{\text{typ}} = 100 \text{ fps}$. Bei dieser Kamera besteht die Möglichkeit, nicht den gesamten Sensor, sondern einen minimalen, zentralen Bereich von $N_x \times N_y = 12 \times 2560$ Pixeln auszulesen und dadurch die Aufnahme rate auf bis zu $R_{\text{read}}^{\text{max}} \approx 5000 \text{ fps}$ zu steigern. Diese Eigenschaft der Kamera wird bei der Lichtblatt-Detektion [Kapitel 7.5.3] für die fluoreszenzmikroskopische Bildgebung ausgenutzt.

7.5. Strahlführung im Anregungs- und Detektionspfad

In Kapitel 7.5.2 wird die Formgebung, Filterung und Ablenkung des Anregungsstrahls im AOD- und Lichtblattpfad bis zum Objektiv beschrieben. Kapitel 7.5.3 befasst sich mit der Formgebung und Filterung der detektierten Fluoreszenz vom Objektiv bis zu den möglichen Detektionsvarianten, der Kamera und dem PMT. Die Strahlführung in den Anregungspfaden [Abb. 7.7] und den Detektionspfaden [Abb. 7.8] zeigt die mittlere Ausleuchtung der Linsen. Die Berechnung der Ablenkung und Formgebung verwendet die Prinzipien der Strahlenoptik [Kapitel 7.5.1].

Sämtliche Referenzen zu optischen, mechanischen und elektrischen Komponenten in den folgenden Kapiteln beziehen sich auf die Konstruktionsansicht [Abb. 7.3] die Strahlführung in den Anregungspfaden [Abb. 7.7] und die Strahlführung in den Detektionspfaden [Abb. 7.8]. Die Indizes der Strahldurchmesser d_L und Foki f_L beziehen sich auf die Komponenten, wie z.B. f_{L1} zu **L1**. Als Strahldurchmesser werden die $1/e^2$ Durchmesser in Anregungs- wie auch Detektionsrichtung mit Bezug zur jeweiligen Komponente angegeben. Die Beschreibung der Strahlführung verläuft im Anregungs- wie auch im Detektionsstrahlengang von links nach rechts.

In den Beleuchtungspfaden [Kapitel 7.5.2] werden die Spiegel **M1-M5** und **SM1-SM2** mit 97 % Reflektivität bei $\lambda_{\text{ex}} = 491 \text{ nm}$ gewählt, da minimale Transmissionsverluste durch die Laserleistung von $P_L = 50 \text{ mW}$ ausgeglichen werden können. Die Linsen **L1-L4** wie auch die Zylinderlinsen **CL1-CL3** sind im Wellenlängenbereich $350 - 700 \text{ nm}$ antireflexbeschichtete und sphärisch korrigierte Plankonvexlinsen ohne chromatische Korrektur, da der Mikroskopaufbau monochromatische Beleuchtung verwendet. Der gleichzeitige Einsatz mehrerer Laser mit verschiedenen Wellenlängen im Beleuchtungspfad ist in der vorgestellten Konfiguration also nicht möglich.

Im Anregungs-Detektionspfad, in dem entweder nur Detektion oder sowohl Anregung als auch Detektion stattfindet, werden die Spiegel **M6-M8**, **SM3** und der Galvanometer-Spiegel **GM** passend zum Emissionsspektrum von GFP^[197] mit 99 % mittlerer Reflektivität im Bereich $500 - 550 \text{ nm}$ gewählt. Die Linsen **L5-L10** sind sowohl sphärisch als auch chromatisch korrigiert und antireflexbeschichtet.

7.5.1. Berechnung der Strahlführung

Zur Berechnung der Strahlversätze, Strahldurchmesser sowie Ein- und Ausfallswinkel in den Anregungs- und Detektionspfaden werden die Gesetze der Strahlenoptik verwendet. Diese ist im Vergleich zur Wellenoptik eine Näherung zur Strahlbeschreibung, bei nicht beugungsbegrenzten Abbildungen jedoch völlig ausreichend. Das Werkzeug der Strahlenoptik wird Matrizenoptik genannt und vereinfacht die Berechnung längerer Strahlführungen. Bei der Matrizenoptik werden Linsen und freie optische Wege als Matrizen und Lichtstrahlen als Vektoren dargestellt. Die Strahlführung kann als Matrizenmultiplikation berechnet werden. Die Matrizen und Vektoren für dünne Linsen \underline{L} , freie Wegstrecken \underline{T} und Strahlen \vec{R} sind in Gl. (7.2) gezeigt. Abb. 7.6 zeigt häufige Strahltransformationen und die Anordnung zweier Linsen im Keplersystem.

$$\underline{L} = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ -1/f_L & 1 \end{bmatrix}, \quad \underline{T} = \begin{bmatrix} 1 & d_{LL} \\ 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad \vec{R} = \begin{pmatrix} V \\ \alpha_{i,o} \end{pmatrix} \quad (7.2)$$

In Gl. (7.2) bezeichnet die Matrix \underline{L} eine Linse mit der Brennweite f_L . Für fokussierende (konvexe) Linsen wird f_L positiv, für konkave negativ gesetzt. Bei dem vorgestellten Mikroskop werden nur fokussierende Linsen verwendet. \underline{T} bezeichnet die Transfermatrix für Bereiche ohne optische Komponenten im Strahlengang. Wenn zwei Linsen A und B im Keplerabstand zueinander sind, gilt $d_{LL} = f_{LA} + f_{LB}$. \vec{R} bezeichnet den Strahl in der Höhe V von der optischen Achse, unter dem Winkel $\alpha_{i,o}$ (i: in, o: out) zur optischen Achse. Die Matrizenmultiplikation muss in umgekehrter Reihenfolge zur Strahlführung berechnet werden. Wendet man Gl. (7.2) auf die Beispiele in Abb. 7.6 an erhält man Gl. (7.3) und Gl. (7.4).

$$\underline{T}_B \cdot \underline{L}_B \cdot \underline{T}_{AB} \cdot \underline{L}_A \cdot \underline{T}_A \cdot \vec{R}_i = \vec{R}_o \quad (7.3)$$

$$\vec{R}_o = \begin{pmatrix} -\frac{D_i}{2} \frac{f_{LB}}{f_{LA}} \\ -\alpha_i \frac{f_{LA}}{f_{LB}} \end{pmatrix} \quad (7.4)$$

7.5.2. Punkt- und Lichtblattanregung

In diesem Abschnitt wird die Strahlführung in den Anregungspfaden im Detail beschrieben. Abb. 7.7 dient dabei als Bezug für die Bezeichnungen im AOD- wie auch im Lichtblattpfad.

Der Laserstrahl der Wellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 491 \text{ nm}$ tritt aus dem Laser mit einem Durchmesser $d_{\text{init}} = 700 \mu\text{m}$ aus und wird über die Spiegel **M1** und **M2** auf die optische Achse der Höhe $H_{\text{opt}} = 65 \text{ mm}$ horizontal zur Tischebene justiert. Das Kepler-System, bestehend aus **L1** und **L2**, weitet den Strahl über das Verhältnis ihrer Brennweiten auf: $d_{L2} = 4.2 \text{ mm}$. Im Abstand $f_{L1} = 50 \text{ mm}$ ist die Lochblende **P** (*pinhole*) zur zusätzlichen Strahlreinigung angebracht. Der Spiegel **M3** führt den aufgeweiteten Strahl den beiden Beleuchtungspfaden zu.

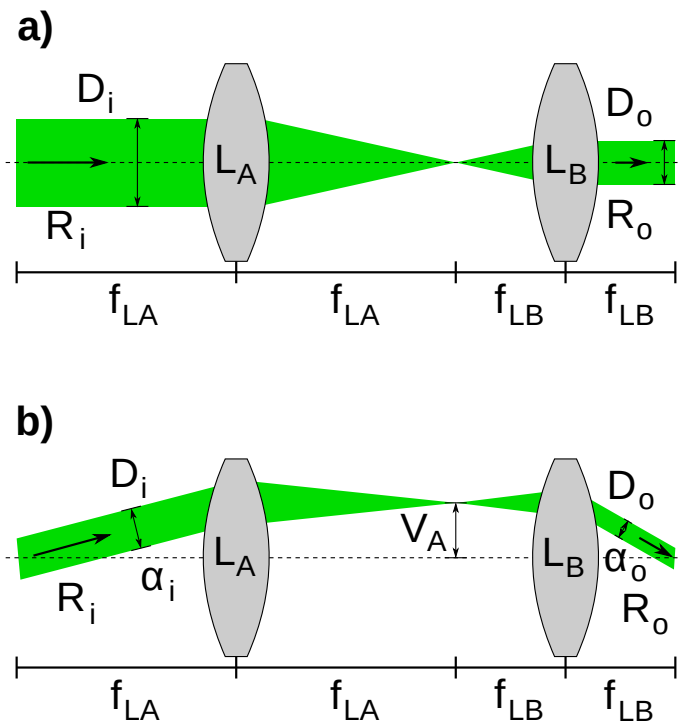


Abbildung 7.6.: Elementare Strahlführung und Keplersystem. Gezeigt sind zwei häufige Beispiele der Strahlführung. Der Lichtstrahl ist grün gezeigt, die optische Achse durch die gestrichelte Linie. L_A und L_B : Konvexlinsen. **a)** gezeigt wird ein Linsenpaar im Keplerabstand $d_{LL} = f_{LA} + f_{LB}$. Ein solches Linsenpaar wird auch Keplersystem genannt. Der Lichtstrahl fällt zentral auf die Linse L_A , wird von diesem im Fokusabstand f_{LA} fokussiert. Der Strahl defokussiert anschließend und wird von der Linse L_B im Abstand von der Linse L_A [$d_{LL} = f_{LA} + f_{LB}$] parallelisiert. Der Strahldurchmesser D_o kann durch das Verhältnis der Fokusabstände f_{LA} und f_{LB} und dem Durchmesser D_i des einfallenden Strahls R_i berechnet werden. **b)** gezeigt wird eine typische Strahlführung, wenn der Lichtstrahl R_i im Winkel α_i zur optischen Achse auf die Linse trifft. Strahlversatz parallel zur optischen Achse: $V_A = f_{LA} \tan(\alpha_i)$. Die Strahldurchmesser sind durch die Fokusabstände f_{LA} und f_{LB} verknüpft, der Ausfallswinkel des Strahls α_o kann mit Hilfe der Matrizenoptik berechnet werden.

Anregung - AOD-Pfad

Im Falle der AOD-Beleuchtung [a] in Abb. 7.7] wird der Klappspiegel **SM1** auf Transmission geschaltet, wodurch der Anregungsstrahl über den Spiegel **M5** auf den **AOD** gelenkt wird. Zur Säuberung der Polarisierung vertikal zur Tischebene dient der drehbare Polarisationsfilter **F1**. Der **AOD** ist auf einem Goniometer installiert, der die Parallelität des abgelenkten Strahls zur optischen Achse vertikal zur Tischebene sicherstellt. Die Linse **L3** fokussiert den abgelenkten Strahl und richtet ihn parallel zur optischen Achse aus. Nach **L3** wird ein $\lambda/4$ -Plättchen verwendet, um aus der linear polarisierten Ausgangswelle eine zirkular polarisierte Welle zu erzeugen und so die $\sqrt{2}$ -fache Anregungseffizienz zu erreichen. Das Keplersystem aus **L3** und **L4** weitet den Strahl auf $d_{L4} = 5.6 \text{ mm}$ auf und **L4** lenkt ihn zusätzlich auf den Galvanometer-Spiegel **GM**. Die Ablenkung durch den **AOD** erfolgt in der orthogonalen Richtung zum Freiheitsgrad des **GM**, sodass über die synchronisierte Steuerung von **AOD** und **GM** eine zweidimensionale Abrasterung der Probe, wie bei einem LSM möglich ist. Der Unterschied zum LSM an dieser Stelle ist, dass die Abtastrichtungen unterschiedlich schnell gesteuert werden können. Das Keplersystem aus **L5** und **L6** weitet den Strahl wie auch im Falle der Lichtblattbeleuchtung auf $d_{L6} = 11.2 \text{ mm} = \omega_0$ auf und lenkt ihn parallelisiert in das Objektiv.

Da der hintere Objektivaperturdurchmesser, BFA: $D_{\text{Obj}} = 9.5 \text{ mm}$ beträgt, wird das Objektiv überbeleuchtet. Die Abmessungen des Anregungsvolumens in lateraler und axialer Richtung werden in Kapitel 8.1 berechnet.

Die exemplarische Ablenkung um $\gamma_o = 21 \text{ mrad}$ in Abb. 7.7 - a), führt zu einem außermittigen Strahlversatz von $V_{\text{in},\gamma_o} = 1.6 \text{ mm}$ und mit M_{Obj} zu einem Versatz in der Probe von $V_{\text{out},\gamma_o} = 25 \text{ }\mu\text{m}$ [Gl. (7.5)]. Die Beleuchtung erfolgt direkt vor dem Objektiv unter dem Winkel $\varphi_i = 8 \text{ mrad}$, der gleichzeitig dem Austrittswinkel β_o der Fluoreszenz in Abb. 7.8 entspricht.

$$V_{\text{out},\gamma_o} = \frac{V_{\text{in},\gamma_o}}{M_{\text{Obj}}} \quad (7.5)$$

Anregung - Lichtblatt-Pfad

Im Falle der Lichtblattbeleuchtung [b₁, b₂, c in Abb. 7.7] wird der elektronisch steuerbare Klappspiegel **SM1** auf Reflexion gestellt. Dieser führt den Strahl dem Zylinderlinsensystem bestehend aus **CL1**, **CL2** und **CL3** zu. Die Zylinderlinsen **CL1** und **CL2** deformieren den symmetrischen Gaußstrahl zu einem senkrecht zur Tischebene ellipsoidisch elongierten Strahl mit den Halbachsen $d_{\text{CL2,hor}} = 4.2 \text{ mm}$ und $d_{\text{CL2,ver}} = 16.8 \text{ mm}$. Die Zylinderlinse **CL3** fokussiert den Strahl vertikal zur Tischebene und lässt ihn horizontal dazu unverändert. Der Spiegel **M4** lenkt den Strahl auf den reflektierenden Klappspiegel **SM2**. Ab dieser Stelle nehmen die Lichtblattbeleuchtung und die AOD-Beleuchtung denselben Weg. Die Linse **L4** greift den Strahl von **CL3** auf, fokussiert ihn horizontal zur Tischebene und parallelisiert ihn senkrecht dazu über den dichroitischen

Spiegel **D** auf den Galvanometer **GM**.

Während der Strahl vor **CL3** senkrecht zur Tischebene elongiert war, ist er auf dem **GM** horizontal elongiert und vertikal fokussiert. Zusätzlich stellt das System aus **CL3** und **L4** ein Keplersystem horizontal zur Tischebene dar, welches den Strahl in dieser Dimension auf $d_{L4,hor} = 5.6 \text{ mm}$ aufweitet.

Über das Keplersystem **L5**, **L6** und über die Spiegel **M6-M8** wird der Anregungsstrahl mit dem Maß $d_{L6,hor} = 11.2 \text{ mm}$ in das Objektiv gelenkt und von $d_{L5,ver} = 8.4 \text{ mm}$ ausgehend auf die hintere Aperturebene [BFP] des Objektivs fokussiert.

Da die hintere Objektivapertur [BFA] $D_{Obj} = 9.5 \text{ mm}$ beträgt, wird das Objektiv mit $d_{L6,hor} = 11.2 \text{ mm}$ überbeleuchtet. Diese Überbeleuchtung in der horizontalen führt dabei zu einem Lichtblattdurchmesser $d_{sheet}^{ex} = 0.5 \mu\text{m}$ im Arbeitsabstand des Objektivs, siehe Kapitel 8.1.1. Die Höhe des Lichtblattes h_{sheet}^{ex} kann durch den Strahldurchmesser $d_{L6,ver}$ und der Vergrößerung des Objektivs $M_{Obj} = 63$ über Gl. (7.6) abgeschätzt werden. Auf diese Weise wird ein Lichtblatt mit den Abmessungen Gl. (7.7) im Arbeitsabstand des Objektivs, senkrecht zur Tischebene erzeugt. Dieses Lichtblatt kann über die Ansteuerung des **GM** parallel zur Ausdehnung d_{sheet}^{ex} in der Probe verfahren werden.

$$h_{sheet}^{ex} = \frac{d_{L6,ver}}{M_{Obj}} \quad (7.6)$$

$$d_{sheet}^{ex} \times h_{sheet}^{ex} = 0.5 \mu\text{m} \times 130 \mu\text{m} \quad (7.7)$$

Bei einer Ablenkung des Strahls von $\alpha_o = 100 \text{ mrad}$ durch den **GM** wird bei $f_{L5} = 100 \text{ mm}$ ein Strahlversatz von $V_{out,\alpha_o} = 10 \text{ mm}$ parallel zur optischen Achse erreicht. Das Objektiv wird unter dem Winkel $\delta_i = 50 \text{ mrad}$ beleuchtet. Das Objektiv parallelisiert Strahlen, die auf die hintere Aperturebene [BFP] fokussiert werden. Somit kann **L6** und das Objektiv als Keplersystem betrachtet und der Versatz in der Probenebene V_{out,α_o} mittels M_{Obj} über Gl. (7.8) berechnet werden. Die Lichtblätter verlassen unter dem Winkel δ_o das Objektiv.

$$V_{out,\alpha_o} = \frac{V_{in,\alpha_o}}{M_{Obj}} \quad (7.8)$$

Gl. (7.8) beschreibt die Ausdehnung der Fläche senkrecht zu Gl. (7.6). Bei maximal 60 % Ausleuchtung der zwei-Zoll-Linsensysteme kann ein Gebiet von $A_{scan} = 41\,600 \mu\text{m}^2$ [Gl. (7.9)] in der Probenebene abgerastert werden.

$$A_{scan} = 2 \times V_{out,\alpha_o} \times h_{sheet}^{ex} = 320 \mu\text{m} \times 130 \mu\text{m} = 41\,600 \mu\text{m}^2 \quad (7.9)$$

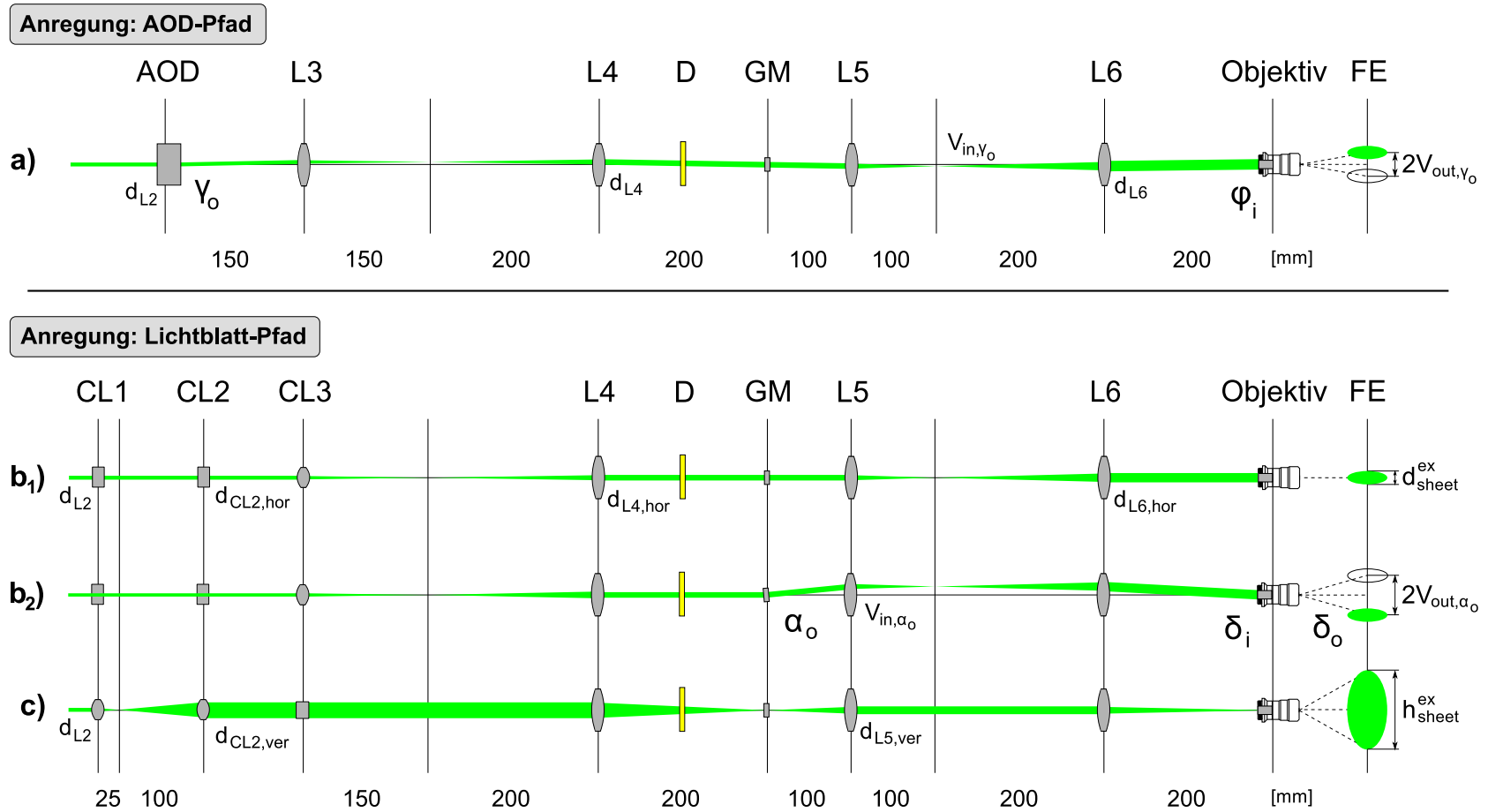


Abbildung 7.7.: Pfade der Punkt- und Lichtblattanregung. Alle Maßangaben in [mm]. Die Angaben „vertikal“ und „horizontal“ sind auf die optische Tischebene bezogen. **L3-L6:** Linsen, **CL1-CL3:** Zylinderlinsen. **D:** Dichroit. **GM:** Galvanometer. **FE:** Fokalebene der Anregung [FWD] mit schematischer Darstellung des beleuchteten fokalen Volumens. Der Abstand zwischen **CL2** und **CL3** ist ein freier Parameter. **a) Horizontalansicht AOD-Pfad** mit gezeigter Strahlablenkung γ_o . **b₁) Vertikalansicht Lichtblatt-Pfad** ohne Strahlablenkung, $\alpha_o = 0$. **b₂) Vertikalansicht Lichtblatt-Pfad** mit gezeigter Strahlablenkung $\alpha_o > 0$ über GM, Beleuchtungswinkel δ_i und Ausfallswinkel δ_o . **c) Horizontalansicht Lichtblatt-Pfad** mit beliebigem α_o .

7.5.3. Detektion der Fluoreszenz über PMT und Kamera

In diesem Abschnitt wird die Strahlführung in den Detektionspfaden beschrieben. Abb. 7.8 dient dabei als Bezug für die Bezeichnungen im AOD- wie auch im Lichtblattpfad.

In der Probe werden Fluorophore entsprechend ihrer Polarisierung angeregt [Kapitel 1.2.1] und verhalten sich aus der Sicht des Objektivs wie Punktstrahler. Diese Punktstrahler sind im Falle der Lichtblattbeleuchtung näherungsweise in einer Dimension, der Länge des Lichtblattes $h_{\text{sheet}}^{\text{ex}}$ nach angeordnet, weshalb die Strahlform der Detektion hinter dem Objektiv aus überlagerten parallelen Strahlen mit verschiedenen Austrittswinkeln besteht [Pfad **b**₂ in Abb. 7.8]. Alle Strahlen, die von Punktstrahlern stammen, haben hinter dem Objektiv den Durchmesser $D_{\text{Obj}} = 9.5 \text{ mm}$ mit verschiedenen Austrittswinkeln. Die Einzelstrahldurchmesser werden von den Linsen im Detektionspfad zwar beeinflusst, spielen aber für die Detektion selbst eine untergeordnete Rolle. Bei der Beleuchtung über den **AOD** entsteht die Superposition aus Einzelstrahlen in Detektionsrichtung nicht, dort wird gleichzeitig lediglich ein beugungsbegrenztes Volumen angeregt, das nach der Defokussierung durch das Objektiv unter einem festen Winkel in den Detektionspfad gelenkt wird.

Detektion - AOD-Pfad

Die Anregung eines fokalen Volumens in der Beispielrechnung [Gl. (7.5)] unter dem Winkel $\varphi_i = 8 \text{ mrad}$ hat einen Detektionsstrahl mit dem Durchmesser $D_{\text{Obj}} = 9.5 \text{ mm}$ unter dem Winkel $\beta_o = 8 \text{ mrad}$ zur Folge. Das Keplersystem aus **L6** und **L5** verringert den Strahldurchmesser auf $d_{\text{L5}} = 4.8 \text{ mm}$. Der Detektionsstrahl trifft den Galvanometer **GM** mittig und wird vom Dichroiten **D** transmittiert. Der Strahl wird von **L7** parallel zur optischen Achse auf die Schlitzblende **S** fokussiert, die für die Tiefendiskriminierung des Detektionsvolumens verantwortlich ist. An der Schlitzblende führt der Detektionswinkel von $\beta_o = 8 \text{ mrad}$ zu einem vertikalen Fokusversatz von $V_{\text{out,S}} = 4.0 \text{ mm}$. Die Höhe des Detektionsschlitzes h_r muss damit für die volle Abtastung in der Probenebene von $2V_{\text{out},\gamma_o} = 50 \mu\text{m}$ mindestens $h_r = 8.0 \text{ mm}$ betragen. In Detektionsrichtung hinter der Schlitzblende **S** befindet sich der Klappspiegel **SM3**, der bei Reflexion das detektierte Volumen auf die **Kamera** lenkt und bei Transmission die Detektion über den **PMT** ermöglicht. Hierbei lenkt die Linse **L8** den detektierten Strahl mit dem Durchmesser $d_{\text{L8}} = 4.8 \text{ mm}$ auf den Sensor des **PMT**. Steht **SM3** auf Reflexion, lässt sich das Detektionsprofil mit Hilfe der **Kamera** vermessen. Der beispielhafte Versatz in der Probenebene $V_{\text{out},\gamma_o} = 25 \mu\text{m}$ führt zu einem Versatz auf dem Kamerasensor $V_{\text{out,K}} = 8.0 \text{ mm}$.

Bei einem gewöhnlichen LSM würde an der Stelle des Detektionsschlitzes **S** eine Lochblende (*pinhole*) eingesetzt. Dies funktioniert jedoch nur mit einer Strahlablenkungsmethode, die näherungsweise wellenlängenunabhängig arbeitet, beispielsweise ein Spiegel. Der verwendete AOD ist jedoch wellenlängenabhängig [Gl. (7.1)] weshalb der detektierte Strahl nicht über diesen rückgeführt werden kann [Kapitel 7.4.1]. Eine ausreichende Tiefendiskriminierung eines symmetrischen Gaußstrahls über einen dünnen Schlitz ist aber, wie in Kapitel 8.1.2 gezeigt wird, auch möglich.

Detektion - Lichtblatt-Pfad

Die Lichtblattpunktstrahler aus dem angeregten Volumen [Gl. (7.7)] im Arbeitsabstand des Objektivs erzeugen hinter diesem symmetrische, parallelisierte Gaußstrahlen unter verschiedenen Winkeln mit dem Durchmesser $D_{\text{Obj}} = 9.5 \text{ mm}$, die nach der ersten Fokussierung bei **L6** parallel zur Tischebene angeordnet sind. Die Ausdehnung des Lichtblatts nach **L6**, definiert durch die fokussierten Punktstrahler, beträgt vertikal zur Tischebene $h_{\text{sheet,L6}}^{\text{det}} = 8.4 \text{ mm}$. Die detektierten Einzelstrahlen werden über das Keplersystem **L6** und **L5** im Durchmesser auf $d_{\text{L5}} = 4.8 \text{ mm}$ halbiert. Das Keplersystem aus **L7** und **L5** weitet das detektierte Lichtblatt im Verhältnis ihrer Brennweiten auf $h_{\text{sheet,L5}}^{\text{det}} = 12.6 \text{ mm}$ vertikal zur Tischebene auf. **L5** fokussiert die Einzelstrahlen des Lichtblattes senkrecht zur Tischebene auf den **GM**.

Im Unterschied zum Beleuchtungspfad wird im Anschluss der Strahl von **D** transmittiert und von **L7** auf die Schlitzblende **S** im Fokusabstand $f_{\text{L7}} = 150 \text{ mm}$ fokussiert. Diese Blende übernimmt hier die Rolle der Tiefendiskriminierung bei der Bildgebung. Die Tiefendiskriminierung eines Lichtblattvolumens wurde bereits mit Erfolg durch Lee et al.^[184] getestet und wird deshalb übernommen.

Das Keplersystem aus **L7** und **L9** vergrößert den Strahldurchmesser auf $d_{\text{L9}} = 6.4 \text{ mm}$. Über den auf Reflexion gestellten Klappspiegel **SM3** nach **S** wird das Lichtblatt nach dem spektralen Bandpassfilter **F3** auf die **Kamera** fokussiert. Das Keplersystem aus **L9** und **L10** weitet das Lichtblatt in vertikaler Richtung auf: $h_{\text{sheet,L10}}^{\text{det}} = 16.8 \text{ mm}$, parallelisiert diese Richtung und fokussiert sie auf die Mitte des Kamerasensors.

Da der Galvanometer **GM** sowohl im Beleuchtungs- als auch Detektionspfad eingebunden ist, wird jede mögliche Ablenkung des Lichtblatts durch den GM-Spiegel bei der Detektion rückgeführt (*descanning*). Damit wird jedes detektierte Lichtblatt auf denselben Ort auf der Schlitzblende **S** und damit auch auf der **Kamera** fokussiert. Dies erlaubt die Fluoreszenzmikroskopie von großen Gebieten in der Probenebene. Laut persönlicher Kommunikation mit Adal Sabri ist die Abtastung eines Gebietes von bis zu $A_{\text{scan}} = 0.13 \text{ mm}^2$ in der Probenebene möglich:

$$A_{\text{scan}} = 1 \text{ mm} \times 0.13 \text{ mm} = 0.13 \text{ mm}^2$$

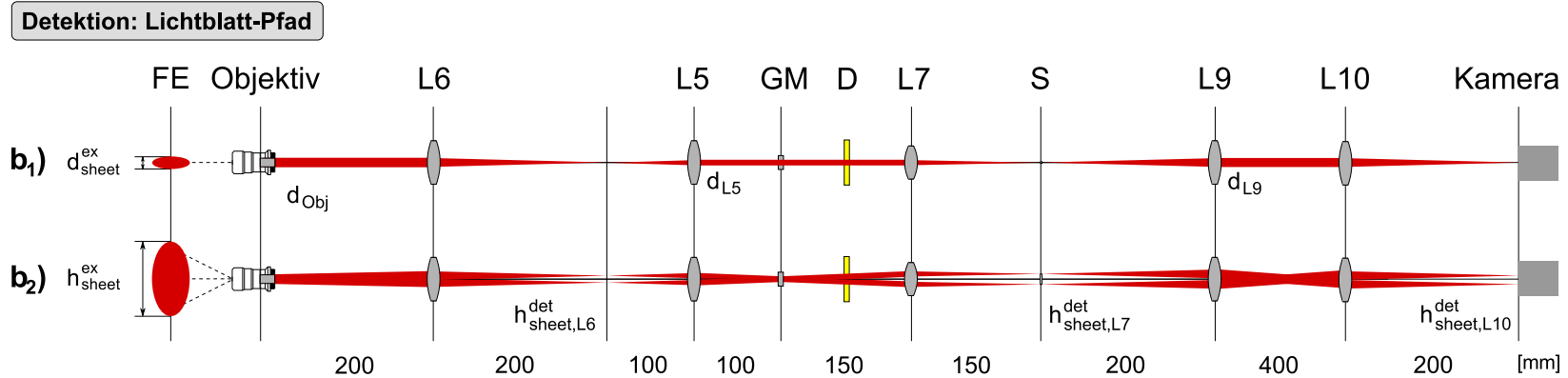
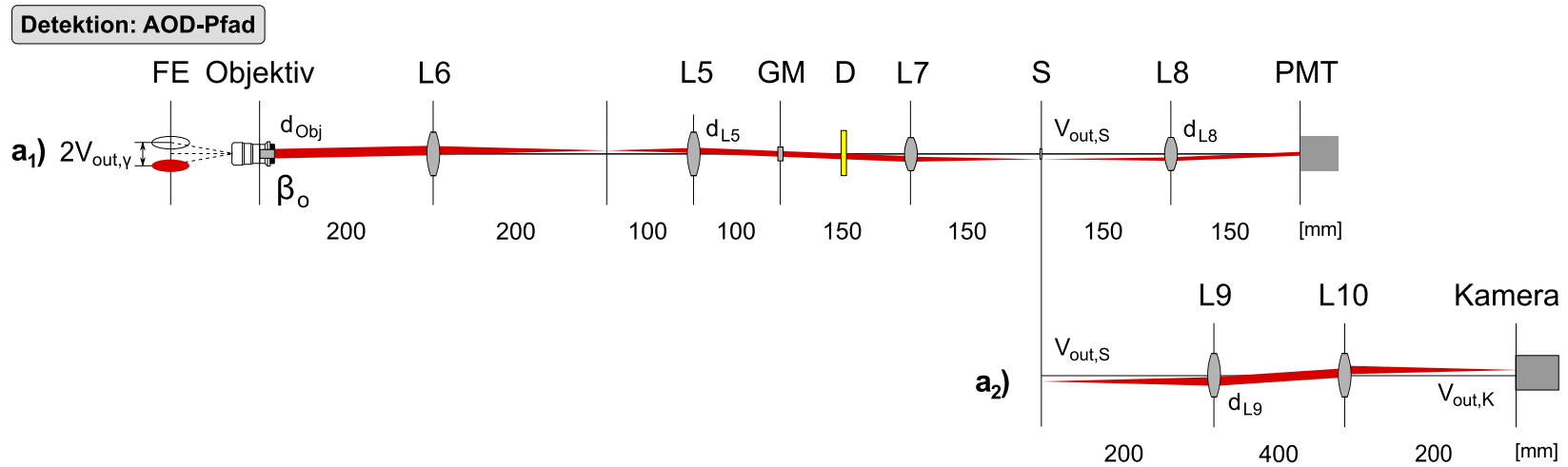


Abbildung 7.8.: Detektionspfade der Punkt- und Lichtblattanregung. Gezeigt sind die Detektionspfade der Punkt- und Lichtblattanregung. Alle Maßangaben in [mm]. Die Angaben „vertikal“ und „horizontal“ sind auf die Tischebene bezogen. Detektionsrichtung: **Objektiv** → **Kamera**. **L5-L10:** Linsen. **GM:** Galvanometer. **D:** Dichroit. **S:** Schlitzblende. **FE:** Fokalebene der Detektion. Vor dem Objektiv in Detektionsrichtung ist das fokale Volumen gezeigt. **a1)** **AOD-Pfad**; Detektion über **PMT**. **a2)** Alternativer Detektionspfad der Punktbeleuchtung über die Kamera. **b1)** **Lichtblatt-Pfad**, vertikale Ansicht, **b2)** horizontale Ansicht der Lichtblattdetektion.

Charakterisierung und erste Anwendung

Da der Aufbau über kontinuierliche Messdistanzen im Mehrfokusbetrieb verfügen soll und der Detektionsstrahl nicht wie bei einem herkömmlichen LSM vollständig rückgeführt (*descanning*) werden kann, ist die Verwendung eines dünnen Schlitzes (*pin slit*) notwendig. Dieser übernimmt die Rolle der Tiefendiskriminierung von gewöhnlichen konfokalen Aufbauten, bei denen üblicherweise eine Lochblende (*pinhole*) eingesetzt wird. Eine Tiefendiskriminierung des Mikroskops liegt vor, wenn die axiale Ausdehnung des Detektionsvolumens geringer ist als die des Anregungsvolumens.

Über numerische Berechnungen wird geprüft, ob ein dünner Schlitz in der konfokalen Ebene eine Tiefendiskriminierung erlaubt, und wie stark sich die Asymmetrie des Detektionsschlitzes auf die Asymmetrie der Detektionsfunktion auswirkt. Das laterale Auflösungsvermögen wird berechnet, um den Einfluss der Nebenmaxima der PSF (*point spread function*) zu prüfen und um sicherzustellen, dass bei der geplanten Ausleuchtung der BFA das Rayleighsche Auflösungskriterium erfüllt wird.

Diese Berechnungen sind sowohl für den bildgebenden Beleuchtungspfad als auch für PCF- und FCS-Messungen wichtig, da in letzteren Fällen die Form der Detektionsfunktion in die Theorie der Korrelationsfunktionen mit eingeht^{[178][18]}. Für den bildgebenden Teil ist nur von Wichtigkeit, dass eine Tiefendiskriminierung vorhanden und diese so gut wie möglich ist.

Im Anschluss wird die Berechnung von räumlichen Kreuzkorrelationsfunktionen vorgestellt, wenn die Detektion mit nur einem PMT erfolgt. Zuletzt werden Justagemöglichkeiten des bildgebenden Pfades und die erste Anwendung vorgestellt, die vor der Übergabe des Aufbaus an Adal Sabri erfolgt ist.

8.1. Theoretisches Auflösungsvermögen

Die Ausleuchtung der BFA entscheidet über die Form der PSF und die Intensität der Nebenmaxima. Wird die BFA mit einem schmaleren Strahl beleuchtet als der Apertur-

durchmesser D_{Obj} , entsteht über die fouriertransformierende Wirkung des Objektivs in guter Näherung ein Gaußprofil. Dabei erzeugt ein dünner Beleuchtungsstrahl eine breite PSF und ein breiter Beleuchtungsstrahl eine schmale PSF. Je schmaler die PSF ist umso stärker werden die Nebenmaxima derselben gewichtet.

Die Airy-Funktion, die das Intensitätsprofil im Arbeitsabstand des Objektivs beschreibt, entsteht durch die Ausleuchtung der BFA mit einer ebenen Welle, das heißt einem Gaußstrahl der Breite $\omega_0 = \infty$. Die dazu äquivalente Betrachtung ist die FT einer Kreisscheibe mit dem Durchmesser der BFA, D_{Obj} .

8.1.1. Anregungsfunktion - Laterale Auflösung

Ziel dieser Untersuchung ist es, abzuwägen, ob über die geplante Überbeleuchtung der BFA, $D_{\text{Obj}} = 9.5 \text{ mm}$ mit einem Gaußstrahl der Breite $\omega_0 = 11.2 \text{ mm}$, die Quellen zweier Fluorophore, dargestellt durch zwei PSF auf der Kamera, unterschieden werden können. Des Weiteren soll der Einfluss der Nebenmaxima der berechneten PSF auf die Maximalintensität geprüft werden.

Die Berechnung der PSF verwendet das Konzept der Ewald-Kugel^[139], die im Frequenzraum bestimmt, welche Feldvektoren der Beleuchtung $I'(k_x, k_y)$ zur Erzeugung der Airy-ähnlichen Funktion beitragen. Das Intensitätsprofil der Beleuchtung im Realraum $I(x, y)$ kann durch die FT [Gl. (8.1)] berechnet werden.

$$I(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} I'(k_x, k_y) B(k_x, k_y) T(k_x, k_y) e^{i(k_x x + k_y y)} dk_x dk_y \quad (8.1)$$

In Gl. (8.1) ist $I'(k_x, k_y)$ das Profil des Gaußstrahls vor dem Objektiv, dargestellt im Fourierraum, $T(k_x, k_y)$ die Transmissionsfunktion und $B(k_x, k_y)$ die Apodisationsfunktion. $T(k_x, k_y) = 1$ für k_x, k_y innerhalb der Objektivapertur und $T(k_x, k_y) = 0$ sonst. Die Apodisationsfunktion $B(k_x, k_y)$ stellt sicher, dass die Intensitäten aller fokussierten Strahlen im Arbeitsabstand des Objektivs gleich gewichtet werden^{[198] [199]}.

$$I'(k_x, k_y) = \exp \left(\frac{-(k_x^2 + k_y^2)}{(\frac{\omega_0}{D_{\text{Obj}}} k_0 \text{NA})^2} \right), \quad B(k_x, k_y) = \sqrt{\frac{k_n}{\sqrt{k_n^2 - k_x^2 - k_y^2}}}. \quad (8.2)$$

Dabei ist $k_n = \frac{2\pi}{\lambda_{\text{ex}}} n$, der Radius der Ewald-Kugel, λ_{ex} die Wellenlänge des Lasers, n der Brechungsindex des Immersionsmediums, NA die numerischen Apertur des Objektivs, $k_0 = \frac{k_n}{n}$, ω_0 der Strahldurchmesser und D_{Obj} die Aperturöffnung des Objektivs. Für den Aufbau wurde ein Wasserimmersionsobjektiv verwendet, daher gilt $n = 1.33$. Weitere Parameter für die numerische Berechnung sind in Gl. (8.3) aufgeführt. Nach numerischer Berechnung von Gl. (8.1) erhält man die Darstellung der PSF $I(x, y)$, die in Abb. 8.1 gezeigt ist.

$$\begin{aligned}
 N &= 2^{14}, & K &= 2000, \\
 dk &= \frac{K}{N}, & dx &= \frac{2\pi}{K}, \\
 x_{\min} &= -\frac{1}{2}Ndx, & x_{\max} &= \frac{1}{2}Ndx, \\
 k_{\min} &= -\frac{1}{2}Ndk, & k_{\max} &= \frac{1}{2}Ndk.
 \end{aligned}
 \tag{8.3}$$

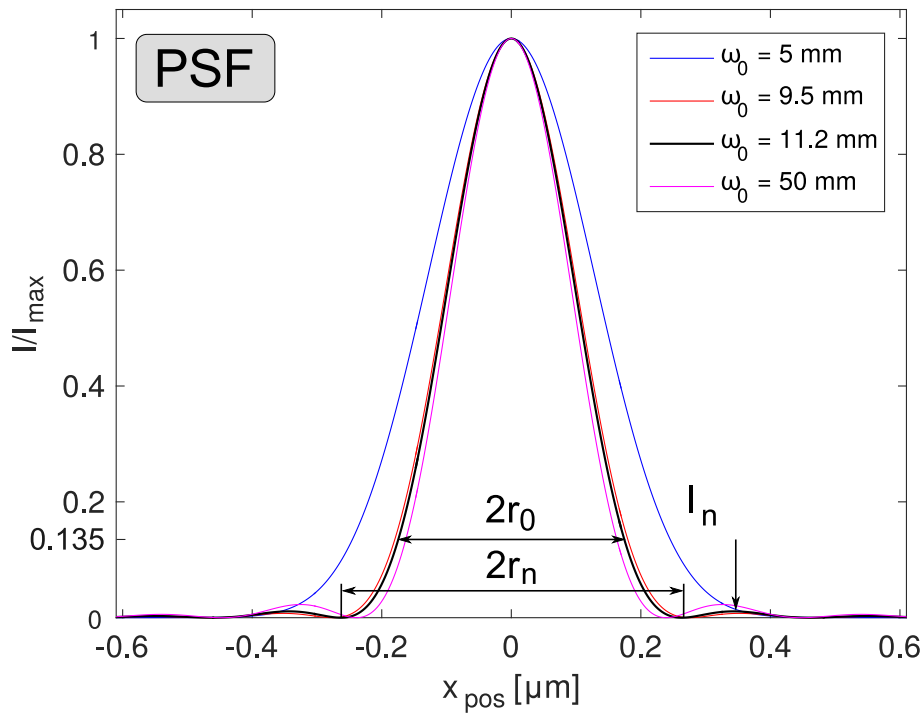


Abbildung 8.1.: Punktspreizfunktion (*point spread function*) - Schnitt durch das fokale Volumen im Arbeitsabstand des Objektivs. Die Abbildung zeigt das normierte Intensitätsprofil der PSF $I(x, y = 0)$ im Arbeitsabstand [FWD] des Objektivs. An der Ordinate ist der $1/e^2$ -Wert der maximalen Intensität: $I_e = 0.135 \cdot I_{\max}$ [$I_{\max} = I(0, 0)$] gezeigt. ω_0 bezeichnet den Durchmesser des gaußförmigen Beleuchtungsstrahls vor dem Objektiv. Gezeigt sind PSF-Profile mit verschiedenen Ausleuchtungen der hinteren Objektivapertur [BFA], [$D_{\text{Obj}} = 9.5 \text{ mm}$]: $\omega_0 < D_{\text{Obj}}$, $\omega_0 = D_{\text{Obj}}$, $\omega_0 > D_{\text{Obj}}$ und $\omega_0 \gg D_{\text{Obj}}$. Die deutliche Unterbeleuchtung mit $\omega_0 = 5 \text{ mm}$ führt zu einer sehr breiten gaußförmigen PSF, die nicht das Rayleighsche Auflösungskriterium erfüllt. Die deutliche Überbeleuchtung mit $\omega_0 = 50 \text{ mm}$ führt zur schmalsten PSF, ist aber technisch nicht realisierbar. Der Durchmesser des Anregungsstrahls wird auf $\omega_0 = 11.2 \text{ mm}$ festgelegt. Die Intensität des ersten Nebenmaximums I_n bei diesem Beleuchtungsstrahldurchmesser beträgt $I_n = 0.008 \cdot I_{\max}$. Bei $\omega_0 \rightarrow \infty$ entspricht die PSF der FT einer Kreisscheibe mit dem Durchmesser der BFA. Bei $\omega_0 = 11.2 \text{ mm}$ erhält man folgende Parameter der PSF: Durchmesser $2r_0 = 0.348 \text{ }\mu\text{m}$ und den Abstand der ersten Nebenminima: $2r_n = 0.528 \text{ }\mu\text{m}$. Die Position des ersten Nebenminimums r_n definiert das laterale Auflösungsvermögen des Mikroskops.

Der Radius der berechneten PSF wird zu Gl. (8.4) bestimmt. Dieser Wert wird im nächsten Kapitel zur axialen Auflösung des Mikroskops für die Näherung der PSF durch ein gaußförmiges Beleuchtungsprofil benötigt.

$$r_0 = 0.174 \mu\text{m} \quad (8.4)$$

Das theoretische Auflösungsvermögen nach Rayleigh bei $\lambda_{\text{ex}} = 491 \text{ nm}$ und der numerischen Apertur des Objektivs $\text{NA} = 1.2$ ist durch Gl. (8.5) gegeben. Dieses Auflösungsvermögen wird im Grenzfall erreicht, wenn die BFA mit einer ebenen Wellenfront beleuchtet wird.

$$d_0^{\text{ray}} = \frac{1.22\lambda_{\text{ex}}}{2\text{NA}} = 0.249 \mu\text{m} \quad (8.5)$$

Das theoretische laterale Auflösungsvermögen des Mikroskops erhält man durch die Auswertung der ersten Nebenminima r_n von $I(x, y)$ in Gl. (8.1). Man erhält Gl. (8.6).

$$r_n = 0.264 \mu\text{m} \quad (8.6)$$

Da das Beleuchtungsprofil keine ebene Wellenfront besitzt, gilt immer $r_n > d_0^{\text{ray}}$. Nach Festlegung der Objektivausleuchtung mit einem Laserstrahl der Breite $\omega_0 = 11.2 \text{ mm}$ ist zu testen, ob das theoretische Auflösungsvermögen des Mikroskops mit den berechneten Positionen der ersten Nebenminima $r_n = 0.264 \mu\text{m}$ signifikant eingeschränkt wird.

Für die Prüfung der Unterscheidbarkeit zweier Fluorophore im Rayleigh-Abstand werden zwei numerisch berechnete PSF im Abstand $d_0^{\text{ray}} = 0.249 \mu\text{m}$ summiert und der Intensitätsunterschied ΔI_k [Gl. (8.7)] der Summenfunktion I_k bestimmt.

$$\Delta I_k = I_k(\approx \pm d_0^{\text{ray}}/2) - I_k(0) \quad (8.7)$$

Man erkennt in Abb. 8.2 einen Intensitätsunterschied $\Delta I_k = 18.4 \%$. Dies bedeutet, dass bereits mit einer Kamera, die zehn verschiedene Intensitätswerte unterscheiden kann, zwei PSF im Abstand d_0^{ray} unterscheidbar sind. Auch die ersten Nebenmaxima der PSF sind bei dem Beleuchtungsdurchmesser von $\omega_0 = 11.2 \text{ mm}$ gering: $I_n = 0.008 \cdot I(0, 0)$.

Das nächste Kapitel befasst sich mit der axialen Auflösung, die sowohl die detektierte Schichtdicke einer Probe als auch die axiale Ausdehnung z_0 des konfokalen Volumens bei Korrelationsanwendungen bestimmt.

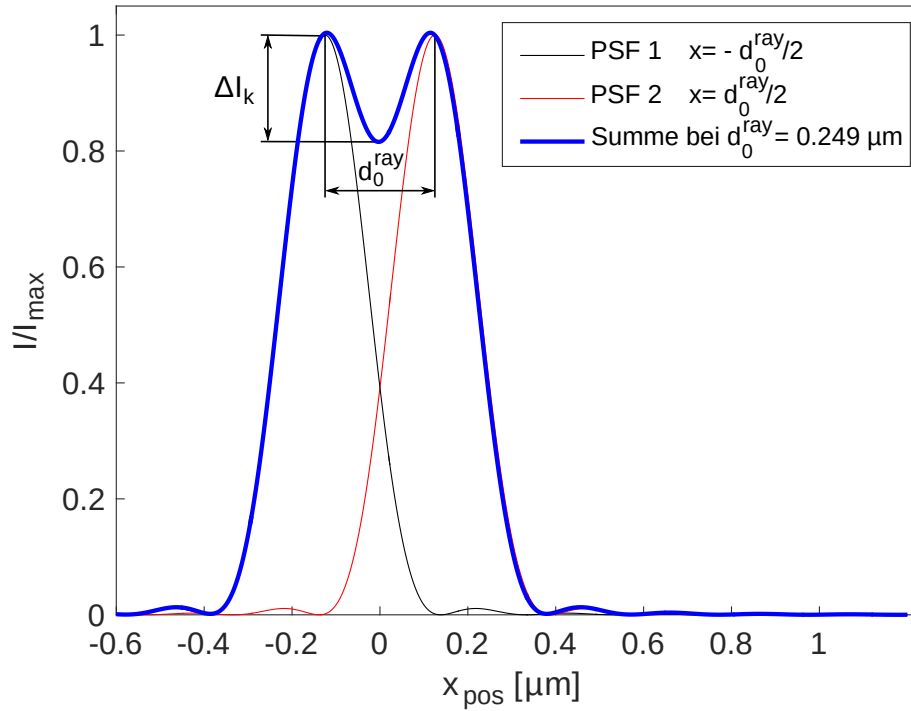


Abbildung 8.2.: Laterales Auflösungsvermögen im Beleuchtungspfad. Die Abbildung zeigt zwei theoretische Punktspreizfunktionen: „PSF 1“ (schwarz), „PSF 2“ (rot) und die **Summe** beider (blau) im Abstand $d_0^{\text{ray}} = 0.249 \mu\text{m}$. Die Abszisse x_{pos} zeigt den lateralen Versatz der beiden PSF, die Ordinate die normierte Intensität I/I_{\max} . Die beiden theoretischen PSF sind das Resultat der Beleuchtung des Objektivs mit einem Gaußstrahl der Breite $\omega_0 = 11.2 \text{ mm}$. Die Radien der einzelnen PSF sind $r_n = 0.264 \mu\text{m}$. Der Intensitätsunterschied beträgt $\Delta I_k = 18.4\%$. Da $\Delta I_k/2 \approx 10\%$ gilt, genügt für die Unterscheidbarkeit zweier PSF im Abstand von d_0^{ray} eine Kamera, die sensitiv für mindestens zehn verschiedene Intensitätswerte ist.

8.1.2. Detektionsfunktion - Axiale Auflösung

Zur Berechnung der MDE (*molecule detection efficiency*) [Gl. (8.8)], die das tatsächlich detektierte Volumen repräsentiert, wird nach einer geometrischen Approximation von Enderlein et al.: *Optical collection efficiency function in single-molecule detection experiments*^[200] vorgegangen. Diese Näherung stimmt, wie dort berichtet, gut mit der fourieroptischen Betrachtung überein, ist jedoch numerisch einfacher zu lösen. Man berechnet hierfür die CEF (*collection efficiency function*) und das als gaußförmig angenäherte Beleuchtungsprofil $I(x, y, z)$ [Gl. (8.9)] im Realraum und bildet das Produkt der beiden:

$$\text{MDE}(x, y, z) = I(x, y, z) \cdot \text{CEF}(x, y, z). \quad (8.8)$$

Diese Näherung ist in Anbetracht der geringen Einflüsse der Nebenmaxima der PSF [Abb. 8.1], zulässig.

$$I(x, y, z) = \frac{2P_L}{\pi\omega^2(z)} \exp\left(-2\frac{x^2 + y^2}{\omega^2(z)}\right), \quad \omega^2(z) = r_0^2 + z^2 \left(\frac{\lambda_{\text{ex}}}{n\pi r_0}\right)^2. \quad (8.9)$$

Gl. (8.9) beschreibt das in z -Richtung elongierte und in $x - y$ -Richtung rotationsymmetrische Beleuchtungsprofil in der Gaußschen Approximation mit $r_0 = 0.174 \mu\text{m}$ [Kapitel 8.1.1, Gl. (8.4)]. r_0 ist mit dem lateralen Auflösungsvermögen r_n verknüpft über $r_n = r_0\sqrt{\ln(4)}$ ^[201]. In der numerischen Berechnung der MDE wird die maximale Laserleistung des Cobolt-Calypso-Lasers $P_L = 50 \text{ mW}$ und die Laserwellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 491 \text{ nm}$ verwendet. Das verwendete Leica-Objektiv ist ein Wasserimmersionsobjektiv, daher wird der Brechungsindex von Wasser $n = 1.33$ verwendet. In Abb. 8.3 ist die Schlitzblende, für die Gl. (8.10) gilt, gezeigt.

$$\begin{aligned} \text{CEF}(x, y, z) = \frac{1}{2\pi(1 - \cos(\psi))} \int_{v_{\min}(z)}^{v_{\max}(z)} \frac{|z|}{z^2 + (v - y)^2} \cdot \\ \cdot \left[\frac{w - x}{\sqrt{z^2 + (v - y)^2 + (w - x)^2}} \right]_{w_{\min}(v)}^{w_{\max}(v)} dv \end{aligned} \quad (8.10)$$

mit:

$$\begin{aligned} v_{\min}(z) &= \max(-d_s/2, y - |z| \tan(\psi)), \\ v_{\max}(z) &= \min(d_s/2, y + |z| \tan(\psi)), \\ w_{\min}(v) &= \max\left(-h_s/2, x - \sqrt{|z|^2 \tan^2(\psi) - (v - y)^2}\right), \\ w_{\max}(v) &= \min\left(h_s/2, x + \sqrt{|z|^2 \tan^2(\psi) - (v - y)^2}\right), \\ \psi &= \arcsin\left(\frac{\text{NA}}{n}\right). \end{aligned} \quad (8.11)$$

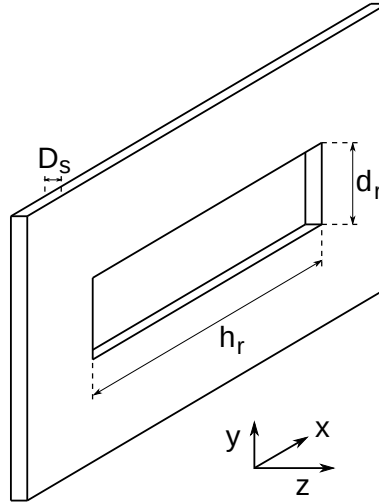


Abbildung 8.3.: Skizze des Detektionsschlitzes. Die Abbildung zeigt die Abmessungen im Realraum (Index „r“) und die Ausrichtung des Detektionsschlitzes im Mikroskopaufbau. Die Schlitzblende ist in x -Richtung elongiert, $h_r = 12$ mm. Die Spaltbreite in y -Richtung kann eingestellt werden, für die Berechnung des axialen Auflösungsvermögens gilt $d_r = 20$ μ m. Die Detektion erfolgt in z -Richtung entsprechend zu Gl. (8.9). Die Dicke des Schlitzes beträgt $D_s = 0.5$ mm, welche jedoch bei der Berechnung der MDE nicht berücksichtigt wird.

Die $CEF(x, y, z)$ [Gl. (8.10)] beschreibt die räumliche Photonensammelleffizienz (*collection efficiency*) der rechteckigen Schlitzblenden-Apertur [Abb. 8.3]. In Gl. (8.11) sind die Integrationsgrenzen von Gl. (8.10) bezogen auf die Abmessungen der Schlitzblende gezeigt. Die Dimensionen des Schlitzes im Realraum d_r , h_r sind über die Gesamtvergrößerung M_{ges} des Mikroskopaufbaus vom Objektiv bis zur Schlitzblende mit den Dimensionen des Schlitzes im Probenraum d_s , h_s verknüpft [Gl. (8.12)]. Die Objektivvergrößerung beträgt $M_{\text{Obj}} = 63$. Die Restvergrößerung M_{rest} ist durch die Brennweiten der Linsen L5 und L6 zu berechnen [Gl. (8.12)].

$$\begin{aligned} M_{\text{Obj}} &= 63, \\ M_{\text{rest}} &= \frac{f_{L5}}{f_{L6}} = \frac{100 \text{ mm}}{200 \text{ mm}} = \frac{1}{2}, \\ M_{\text{ges}} &= M_{\text{Obj}} \times M_{\text{rest}} = 63 \times \frac{1}{2} = 31.5, \quad d_s = \frac{d_r}{M_{\text{ges}}}, \quad h_s = \frac{h_r}{M_{\text{ges}}}. \end{aligned} \tag{8.12}$$

Die Verwendung einer rechteckigen konfokalen Blende erscheint zuerst widersprüchlich, da die Beleuchtungsfunktion im Allgemeinen rotationssymmetrisch ist. Tatsächlich werden in kommerziellen Konfokalmikroskopen hexagonale oder quadratische Blenden (*pinhole*) verwendet, da bei diesen die Anpassung des Durchmessers an die jeweilige Laserwellenlänge λ_{ex} technisch einfacher ist, und im Vergleich mit kreisförmigen Lochblenden das laterale Auflösungsvermögen steigert^[202].

Die geometrische Approximation nach Gl. (8.10) ist ausreichend, da lediglich die Einnengung des Detektionsvolumens in axialer Richtung geprüft werden soll. Die obigen Berechnungen gehen von einer Schlitzblende der Dicke $D_s = 0$ aus, was in der Praxis nicht

realisiert werden kann. Tatsächlich hat der Schlitz eine Dicke (in Beleuchtungsrichtung: Tiefe) von $D_s = 500 \mu\text{m}$.

Führt man die Berechnungen in Gl. (8.10) und Gl. (8.8) mit der numerischen Auflösung $\Delta x = \Delta y = \Delta z = 5 \text{ nm}$ für die Grenzen [Gl. (8.13)] durch, erhält man die MDE. Die MDE kann durch $(x - z)$ -Schnitte und $(y - z)$ -Schnitte als Intensitätsprofil dargestellt werden. Abb. 8.4 zeigt diese Schnitte durch die Beleuchtungsfunktion $I(x, y, z)$, die CEF und das Detektionsprofil MDE.

$$\begin{aligned} x_{\min} &= -0.5 \mu\text{m}, & x_{\max} &= 0.5 \mu\text{m}, \\ y_{\min} &= -0.5 \mu\text{m}, & y_{\max} &= 0.5 \mu\text{m}, \\ z_{\min} &= -4.0 \mu\text{m}, & z_{\max} &= 4.0 \mu\text{m}. \end{aligned} \tag{8.13}$$

Im Idealfall, wenn bei einem LSM die Abbildung einer Lochblende in den Arbeitsabstand des Objektivs mit den Nebenminima der dort erzeugten PSF zusammenfällt, führt die Lochblende dazu, dass neben der axialen auch die laterale Auflösung des Mikroskops verbessert wird. Dies gilt in erster Linie für eine kreisförmige, quadratische oder hexagonale Blende^[202]. Das laterale Auflösungsvermögen wird in diesem Fall um etwa 30 % gegenüber dem Auflösungsvermögen eines Epifluoreszenzmikroskops erhöht.

Bei der Tiefendiskriminierung über eine Schlitzblende ist zu erwarten, dass sich diese Auflösungsverbesserung durch die $(x - y)$ -Asymmetrie der Blende in einer $(x - y)$ -Asymmetrie der MDE zeigt. Um dies zu prüfen, wird die Differenz ΔMDE der $(x - z)$ - und $(y - z)$ -Schnitte der Detektionsfunktion gebildet und der Maximalwert $\Delta\text{MDE}_{\text{symm}}$ bestimmt:

$$\Delta\text{MDE}_{\text{symm}} = \max[\text{MDE}(x = 0, y, z) - \text{MDE}(x, y = 0, z)].$$

Die Berechnung ergibt $\Delta\text{MDE}_{\text{symm}} = -0.025$, also nahezu keinen räumlichen Intensitätsunterschied zwischen dem $(x = 0)$ - und dem $(y = 0)$ -Schnitt der MDE. Damit kann eine laterale Auflösungsverbesserung über das Rayleighsche Auflösungskriterium hinaus ausgeschlossen werden.

Der axiale Radius der MDE wird durch die Schlitzblende von $z_0^i = 0.517 \mu\text{m}$ auf $z_0^f = 0.388 \mu\text{m}$ mit dem Superskript i: initial und f: final reduziert. Bei FCS- und PCF-Messungen wird daher für den Streckungsfaktor $S^{[178]}$ des konfokalen Volumens $S = z_0/r_0 = 2.234$ erwartet.

Nähert man das konfokale Detektionsvolumen V_{kon} durch ein Ellipsoid mit den Halbachsen $a = 2r_0$, $b = 2r_0$ und $c = 2z_0$, erhält man:

$$V_{\text{kon}} = \frac{4}{3}\pi abc = \frac{32}{3}r_0^2 z_0 = 0.125 \text{ fl.}$$

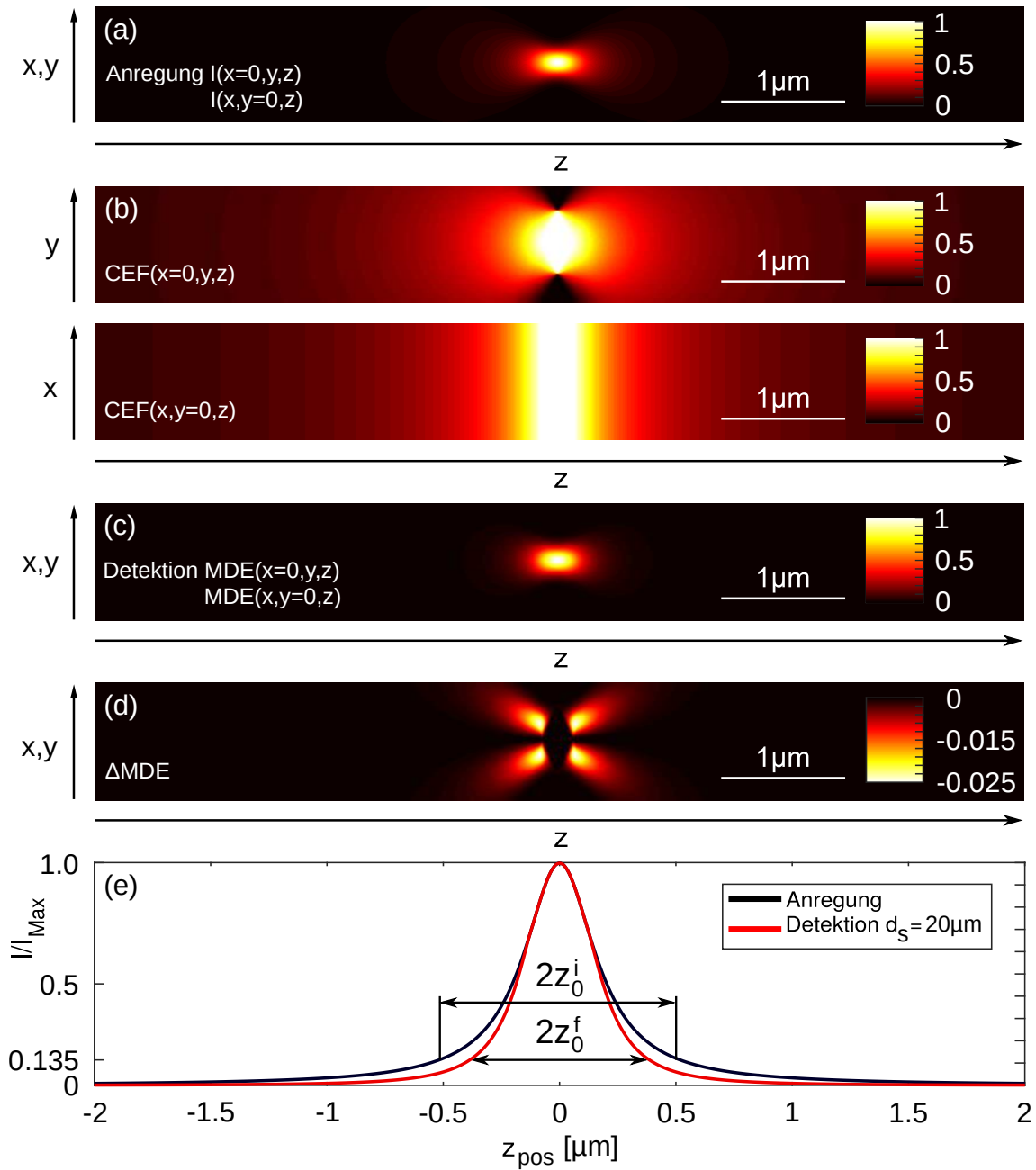


Abbildung 8.4.: Schnitte durch das Anregungs- und Detektionsprofil. Die Abbildung zeigt den **a)** $y - z$ ($x = 0$)- sowie den $x - z$ ($y = 0$)-Schnitt durch das gaußförmige Anregungsprofil. **b)** Die CEF für $x = 0$ und $y = 0$. **c)** Die Detektionsfunktion ist im Intensitätsprofil annähernd symmetrisch bezüglich der x - und y - Achse. **d)** Die Intensitätsdifferenz ΔMDE der Detektionsfunktionen $\text{MDE}(x = 0, y, z)$ und $\text{MDE}(x, y = 0, z)$. Der maximale Unterschied beträgt $\Delta\text{MDE}_{\text{symm}} \approx 2.5\%$. **e)** Das normierte Intensitätsprofil (I/I_{max}) der Beleuchtungsfunktion (**schwarz**) sowie der Detektionsfunktion (**rot**) bei $x, y = 0$. An der Ordinate ist neben der normierten Intensität der $1/e^2$ -Wert der maximalen Intensität, $I_e = 0.135 \cdot I_{\text{max}}$ gezeigt. Die Abszisse zeigt die Position in der Probenebene an. An der Stelle $z_{\text{pos}} = 0$ wird in axialer Richtung die maximale Detektionseffizienz erreicht. Das Anregungsprofil hat einen Radius von $z_0^i = 0.517\mu\text{m}$, die Detektionsfunktion $z_0^f = 0.388\mu\text{m}$.

8.2. Methoden, Anwendungen und Resultate

In diesem Kapitel werden die zwei Hauptanwendungen des Mikroskops vorgestellt. Zum einen wird eine Methode zur Auswertung von räumlichen Kreuzkorrelationen vorgeschlagen, für den Fall der Datenakquise mit nur einem Detektor. Diese Funktion des Mikroskopaufbaus konnte aus zeitlichen Gründen nicht getestet werden. Zum anderen wird das Vorgehen bei der Bildgebung erklärt, das für diesen Mikroskopaufbau notwendig ist, auf Justagemöglichkeiten eingegangen und ein experimentelles Resultat am Beispiel einer *Convallaria*-Probe (*microscope-test-sample*) gezeigt.

8.2.1. Kreuzkorrelationen aus Eindetektor-Aufnahmen

Das folgende Kapitel zeigt, wie bei einer Zweipunktmessung mit nur einem Detektor für die Berechnung der Kreuzkorrelation vorgegangen werden muss. Bei dem vorgestellten Mikroskopaufbau wird bei der AOD-Beleuchtung die Fluoreszenz verschiedener Foki konstruktionsbedingt mit nur einem PMT gemessen. Während der AOD bei der Beleuchtung zwischen zwei Positionen x_1 und x_2 wechselt, wird die Zeitreihe der Fluoreszenz in Echtzeit aufgenommen. Man erhält damit das zeitkontinuierliche Fluktuationsspektrum verschiedener Orte ohne direkte räumliche Trennung. Die räumliche Auflösung in der Zeitreihe ist aber über die Aufenthaltsdauer ΔT_{x_i} der Beleuchtung an den Orten x_i enthalten. Die Zeitreihe $I_F(x_1, x_2, t)$ kann durch N_{per} Perioden und $N_{\text{px}_1} = N_{\text{px}_2} = N_{\text{px}} = \Delta T_x / \Delta t$ Messinkremente je Ort x_i klassifiziert werden. Um die PCF des gemessenen Transportprozesses auszuwerten muss die Zeitreihe $I_F(x_1, x_2, t)$ in zwei Zeitreihen $I'_F(x_1, t)$ und $I'_F(x_2, t)$ aufgeteilt werden. Abb. 8.5 skizziert eine Zeitreihe $I(x_1, x_2, t)$ mit farblich kodierten Aufenthaltsorten und die Trennung dieser in zwei Zeitreihen.

Um zwei Zeitreihen, eine je Messort x_i , zu erhalten, muss die Fluktuationssmessung, wie in Abb. 8.5 skizziert, unterteilt werden. Dabei werden fehlende Messwerte in den jeweiligen Zeitreihen mit Nullen aufgefüllt. Liegen die getrennten Zeitreihen $I'_F(x_1, t)$ und $I'_F(x_2, t)$ vor, lässt sich unter Berücksichtigung der reduzierten Messpunkte N_{px_i} die PCF [Gl. (8.14)] berechnen.

$$\begin{aligned} G(\Delta x, \tau_k) &= \frac{\langle I_F(x_1, t) I_F(x_2, t + \tau_k) \rangle_t}{\langle I_F(x_1, t) \rangle_t \langle I_F(x_2, t) \rangle_t} - 1 \\ &= \left\langle \left(\frac{I_F(x_1, t)}{\langle I_F(x_1, t) \rangle_t} - 1 \right) \left(\frac{I_F(x_2, t + \tau_k)}{\langle I_F(x_2, t) \rangle_t} - 1 \right) \right\rangle_t \end{aligned} \quad (8.14)$$

Die kleinste Korrelationszeit zweier Foki im Abstand $\Delta x = x_2 - x_1$ ist durch die Zeitauflösung der raumzeitlichen Messung gegeben $\tau_{k, \min} = \Delta T_{x_1} + \Delta T_{x_2} + \Delta t$. Bei der Normierung der Paarkorrelationsfunktion [Gl. (8.14)] muss berücksichtigt werden, dass der Mittelwert der Zeitreihe $\langle I_F(x_i, t) \rangle_t$ durch die Leerstellen das Doppelte von $\langle I'_F(x_i, t) \rangle_t$ ist:

$$\langle I_F(x_i, t) \rangle_t = 2 \langle I'_F(x_i, t) \rangle_t. \quad (8.15)$$

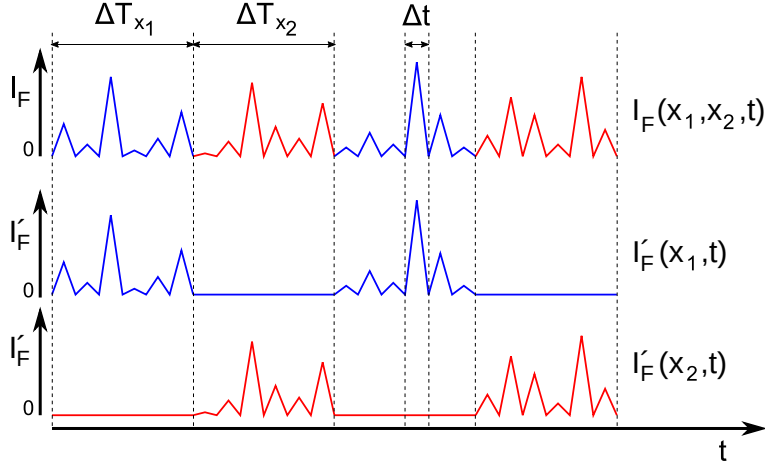


Abbildung 8.5.: Aufspaltung einer Zweipunkt-Fluktuationsmessung in zwei Zeitreihen.

Gezeigt wird die Trennung einer Zeitreihe gemäß der Wechselfrequenz des AOD. ΔT_{x_1} bzw. ΔT_{x_2} ist die Aufenthaltsdauer des Beleuchtungsfokus an einem Ort und Δt die Zeitauflösung der Messung, $\Delta T_{x_i} = N_{\text{px}} \Delta t$. N_{px} : Anzahl der Zeitinkremente Δt an je einem Ort x_1 oder x_2 . Um die Gemeinsamkeiten der Fluktuationen an den beiden Orten x_1 und x_2 mit Hilfe von Paarkorrelationsfunktionen [PCF] aufzudecken, muss die ursprüngliche Zeitreihe $I_F(x_1, x_2, t)$ in die $I'_F(x_{(1,2)}, t)$ wie dargestellt geteilt werden. Die Teilungszeitpunkte sind durch die aktuelle Position der Foki gegeben. Aus praktischen Gründen wählt man $\Delta T_{x_1} = \Delta T_{x_2}$. Die fehlenden Messwerte, im Intervall ΔT_{x_1} in $I'_F(x_2, t)$, und ΔT_{x_2} in $I'_F(x_1, t)$, werden mit Nullen aufgefüllt, um die Zeitkontinuität der Zeitreihen zu gewährleisten.

Um die Paarkorrelationsfunktion $G(\Delta x, \tau_k)$ zu berechnen, müssen einige Veränderungen und Anpassungen auf Gl. (8.14) angewendet werden, da $I_F(x_1, t)$ und $I_F(x_2, t)$ nicht bekannt sind. Im Folgenden wird die Paarkorrelationsfunktion für die Zeitreihen $I'_F(x_1, t)$ und $I'_F(x_2, t)$ berechnet, die durch die Separation von $I_F(x_1, x_2, t)$ [Abb. 8.5] entstanden sind.

Für die numerische Berechnung ist es vorteilhaft die Paarkorrelationsfunktion, $G(\Delta x, \tau_k)$ in $G_+(\Delta x, \tau_{k+})$ und $G_-(\Delta x, \tau_{k-})$ zu unterteilen. Der Grund liegt darin, dass der Überlapp der Zeitreihen keiner monotonen Funktion in Abhängigkeit der Korrelationsverschiebung τ_k , wie bei Autokorrelationsfunktionen üblich, gehorcht. Der Index „+“ bedeutet, dass die PCF in einem Bereich berechnet wird, bei dem der Überlapp der Zeitreihen I'_F zunimmt und „-“, dass der Überlapp abnimmt. Zusätzlich nimmt der Gesamtüberlapp bei wachsendem τ_k in beiden Fällen linear ab. Bei der folgenden Rechnung wird τ_k in Einheiten der Zeitauflösung Δt behandelt.

$$\begin{aligned}
 G_+(\Delta x, \tau_{k+}) &= \frac{1}{N_+} \sum_{q=1}^{2N_{\text{per}}N_{\text{px}} - \tau_{k+}} \left(\frac{I'_F(x_1, q)}{2 \langle I'_F(x_1, t) \rangle_t} - 1 \right) \left(\frac{I'_F(x_2, q + \tau_{k+})}{2 \langle I'_F(x_2, t) \rangle_t} - 1 \right), \\
 \tau_{k+} &= 2N_{\text{px}}(n - 1) + i, \\
 N_+ &= i(N_{\text{per}} - n), \\
 n &= 1 \dots N_{\text{per}} - 1, \\
 i &= 1 \dots N_{\text{px}}.
 \end{aligned} \tag{8.16}$$

$$\begin{aligned}
 G_{-}(\Delta x, \tau_{k-}) &= \frac{1}{N_{-}} \sum_{q=1}^{2N_{\text{per}}N_{\text{px}}-\tau_{k-}} \left(\frac{I'_{\text{F}}(x_1, q)}{2 \langle I'_{\text{F}}(x_1, t) \rangle_t} - 1 \right) \left(\frac{I'_{\text{F}}(x_2, q + \tau_{k-})}{2 \langle I'_{\text{F}}(x_2, t) \rangle_t} - 1 \right), \\
 \tau_{k-} &= N_{\text{px}}(2n - 1) + i, \\
 N_{-} &= (N_{\text{px}} - i)(N_{\text{per}} - n), \\
 n &= 1 \dots N_{\text{per}} - 1, \\
 i &= 1 \dots N_{\text{px}} - 1.
 \end{aligned} \tag{8.17}$$

Iteriert man alle zulässigen n und i in Gl. (8.16) und Gl. (8.17), erhält man die Kreuzkorrelationen für alle möglichen τ_k , bis auf $\tau_{k,\text{ND}} = 2N_{\text{px}}(n - 1)\Delta t$. Dieses periodische $\tau_{k,\text{ND}}$ ist wegen der Aufnahmemethode nicht definiert und tritt immer dann auf, wenn die Verschiebung der Zeitreihen zueinander der Messdauer an einem Ort entspricht.

Wird eine Messung in einer Lösung mit frei diffundierenden Teilchen durchgeführt, die der normalen Diffusion gehorchen, ergibt sich die theoretische Form der Paarkorrelationsfunktion [Abb. 8.6].

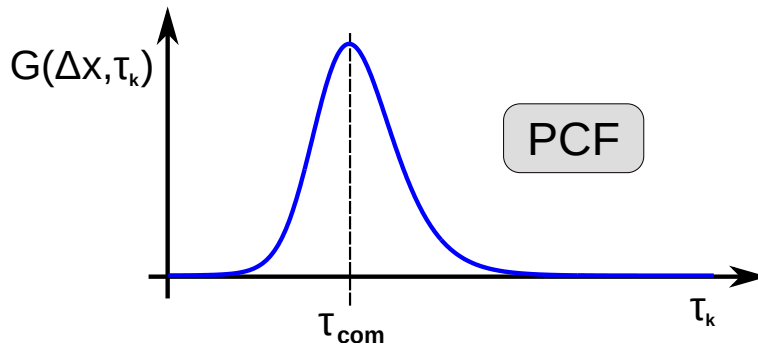


Abbildung 8.6.: Theoretische Paarkorrelationsfunktion. Gezeigt ist eine theoretische Paarkorrelationsfunktion für den Fall, dass die beiden Foki über normale Diffusion kommunizieren. Das Maximum der Paarkorrelationsfunktion definiert die wahrscheinlichste Korrelationszeit τ_{com} des Transports zwischen den Foki im Abstand Δx . Diese Korrelationszeit wird auch Transitzeit genannt.

8.2.2. Bildgebung (*imaging*)

Der bildgebende Teil des Mikroskops über die Lichtblattbeleuchtung wurde vor der Übergabe des Aufbaus an Adal Sabri ohne Skalierungsjustage getestet. Der Ausgangspunkt der Bildgebung ist die, bei der Galvanometerspannung $U = 0$ V auf das Zentrum des Kamerasensors justierte Abbildung eines Lichtblattes. In diesem Abschnitt wird auf die freien Parameter der Bildgebung eingegangen, Justagemöglichkeiten für die Aufnahme übergangsloser Fluoreszenzbilder vorgeschlagen und die erste Anwendung des Mikroskops vorgestellt.

Ansteuerung des Galvanometers und der Kamera

Um ein Fluoreszenzbild einer Probe aufzunehmen, muss der Galvanometer synchron mit der Belichtungszeit der Kamera betrieben werden. Der Galvanometer kann durch Anlegen einer Spannung U im Intervall $\Delta U_{\max} = [-5, 5]$ V um einen zugehörigen Winkel $\alpha_{o,U}$ ausgelenkt werden. Das Spannungsintervall $\Delta U \leq \Delta U_{\max}$ ist dabei eine lineare Funktion des Ablenkwinkels $\alpha_{o,U}$ mit der Proportionalitätskonstante k_{GM} :

$$\Delta U = k_{\text{GM}} \Delta \alpha_o.$$

Die freien Parameter bei der Bildgebung sind die Anzahl der Lichtblätter L , das symmetrische Spannungsintervall ΔU und die Zahl ausgelesener Pixel des Kamerasensors Q . Über $U_L = \Delta U/L$ wird der Spannungsversatz pro Beleuchtungsschritt berechnet. Dabei bestimmt ΔU den abzutastenden Ausschnitt der Probe und L die Feinheit der Abtastung. In jeder Winkelstellung $\alpha_{o,U}$ verweilt der GM und damit das Lichtblatt für die Belichtungszeit t_{int} der Kamera. Sowohl beim Scannen von $-U_0 \rightarrow U_0$ als auch in entgegengesetzter Richtung von $U_0 \rightarrow -U_0$ kann je ein Bild der Probe (zwei Bilder je Periode T_{GM} des GM) aufgenommen werden. Abb. 8.7 zeigt den Zeit- und Spannungsverlauf des Galvanometers bei der Aufnahme zweier Bilder.

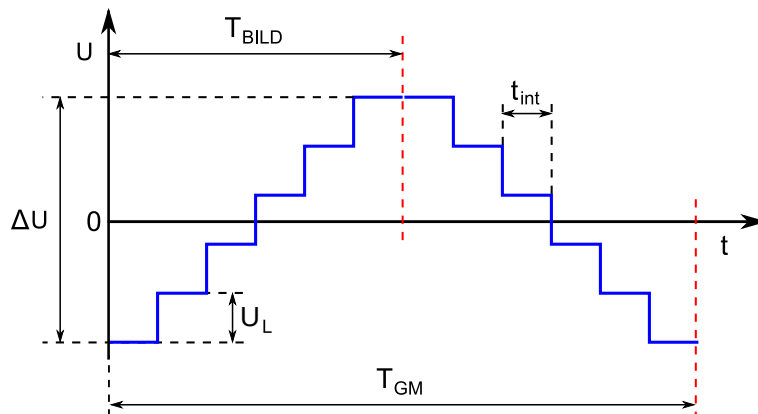


Abbildung 8.7.: Spannungsverlauf des Galvanometers beim Abtasten. Der Graph veranschaulicht den Spannungs-Zeitverlauf $U(t)$ bei der Aufnahme zweier Bilder über die Lichtblattbeleuchtung. Der Spannungsverlauf ist für die Rechts- ($U \uparrow$) wie auch Linksrotation ($U \downarrow$) des Galvanometers gezeigt. Der Galvanometer steuert durch Anlegen des gezeigten Spannungsverlaufs das Lichtblatt schrittweise durch die Probe im Arbeitsabstand [FWD] des Objektivs. An jeder Position verweilt der GM und damit das Lichtblatt für die Belichtungszeit t_{int} der Kamera. Anschließend wird das Lichtblatt weitergefahren. Die Abbildung zeigt eine Periode des Galvanometers, während derer zwei Bilder aufgenommen werden können. ΔU ist das Spannungsintervall für die Aufnahme eines Bildes, T_{BILD} die Aufnahmedauer für ein Bild und T_{GM} die Periodendauer des Galvanometers. In dem gezeigten Beispiel werden $L = 5$ Streifen je Bild verwendet. Die Breite dieser Streifen in der Probenebene ist durch die Dicke des Lichtblattes $d_{\text{sheet}}^{\text{ex}}$ gegeben. Entsprechend muss die Spannung am Galvanometer je Bildstreifen um ein Spannungsinkrement U_L erhöht (rechtsrotierende Aufnahme) oder erniedrigt (linksrotierende Aufnahme) werden, worauf eine Rotation des GM um ein Winkelinkrement $\delta \alpha_o$ folgt. Diese Rotation des GM zeigt sich bei exakter Justage durch einen Versatz des Lichtblattes um $d_{\text{sheet}}^{\text{ex}}$ im Arbeitsabstand des Objektivs.

Justage der Lichtblätter und Bildzusammensetzung

Jeder der unter verschiedenen Winkeln δ_o nacheinander beleuchteten Streifen in der Probenebene mit den Abmessungen $h_{\text{sheet}}^{\text{ex}} \times d_{\text{sheet}}^{\text{ex}}$ emittiert ein Lichtblatt, das auf denselben zentralen Bereich des Kamerasensors abgebildet wird (*descanning*). Je Beleuchtungsschritt wird dieselbe Anzahl Pixel Q des Sensors ausgelesen. Die ausgelesenen L Lichtblätter der Breite Q werden im Rekonstruktionsschritt in Bewegungsrichtung des GM zusammengesetzt.

Bei einer Initialaufnahme sind zwei Situationen möglich. Entweder wird das beleuchtete Gebiet unzureichend oder übermäßig dicht abgetastet. Ersteres führt dazu, dass das zusammengesetzte Bild gestaucht ist, letzteres dazu, dass das Bild gedehnt ist. Die Anzahl der Lichtblätter L und ausgelesenen Kamerapixel Q müssen bei gleichem ΔU zueinander justiert werden, damit das zusammengesetzte Bild übergangslos erscheint. Hierfür stehen drei Wege zur Verfügung.

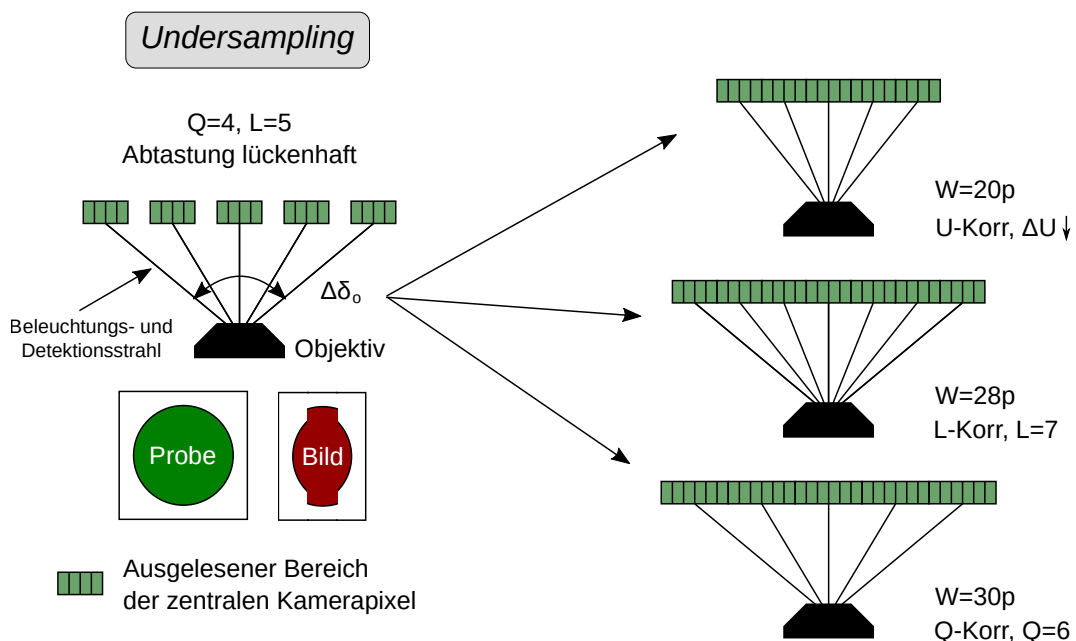


Abbildung 8.8.: Justagemöglichkeiten bei der Bildgebung - Undersampling. Lückenhafte Abtastung: Die Fluoreszenz der Probe wird räumlich nur teilweise gemessen, das Bild ist gestaucht. Initialsituation bei der unzureichenden Abtastung (**Links**) und Justagemöglichkeiten (**Rechts**). Unter den Aufnahmen ist eine kreisförmige Probe (**grün**) und das zusammengesetzte Bild (**rot**) ohne zusätzliche Korrektur gezeigt. Korrekturen der Initialsituation sind über die Veränderung des Spannungsintervalls ΔU (**U-Korr**), der Anzahl der ausgelesenen Lichtblätter (**L-Korr**, Interpolation) oder der Anzahl ausgelesener Kamerapixel je Lichtblatt (**Q-Korr**) möglich. W in [p] ist die Breite des zusammengesetzten Bildes in Pixeln. Die **L**-Lichtblätter sind nach ihrer Breite, die dem, von der Kamera ausgelesenen Anteil entspricht, angeordnet. Die Variation von Q entspricht der Verwendung breiterer oder schmalerer Streifen für die Bildzusammensetzung.

Die Spannungskorrektur U -Korr vergrößert oder verkleinert den abgetasteten Bereich in der Probenebene. Hierbei werden die Spannungskremente U_L angepasst, sodass

bei gleichem Q und L das zusammengesetzte Bild übergangslos erscheint. Bei der Lichtblattzahlkorrektur L -Korr wird versucht, den Überlapp der Lichtblätter in der Probenebene durch eine Verringerung von L und bei der Unterabtastung durch eine Erhöhung von L auszugleichen. Zuletzt hat der Experimentator die Möglichkeit, bei der Pixelzahlkorrektur Q -Korr bei gleichem Spannungsintervall ΔU und gleicher Lichtblattzahl L Übergangskanten oder Fehlstellen im zusammengesetzten Bild durch die Anzahl ausgelesener Pixel auszugleichen. In Abb. 8.8 (*Undersampling*) und Abb. 8.9 (*Oversampling*) sind Justagemöglichkeiten gezeigt, mit deren Hilfe L , Q und U aufeinander abgestimmt werden können.

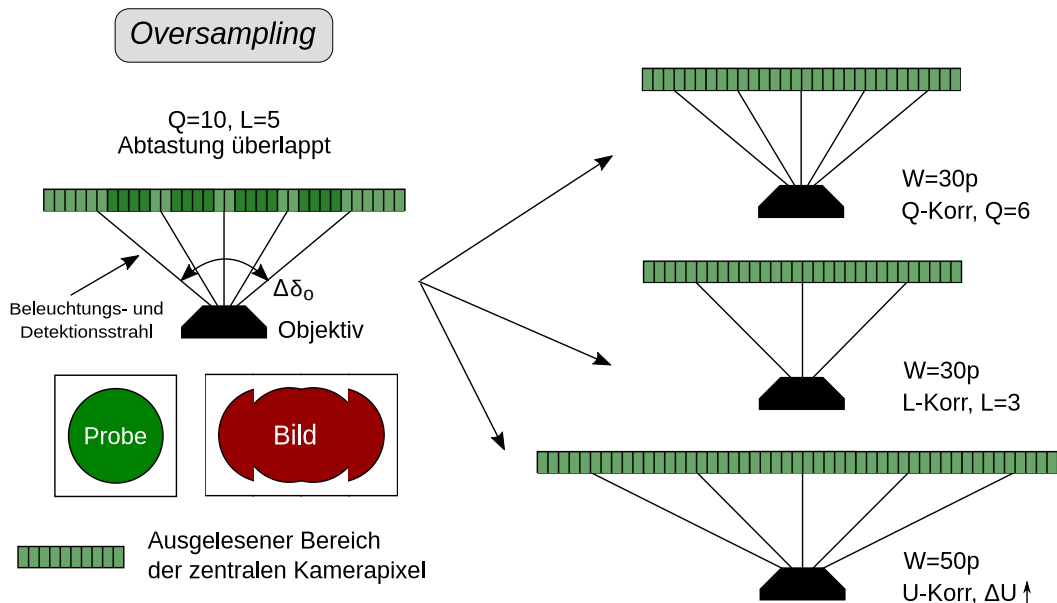


Abbildung 8.9.: Justagemöglichkeiten bei der Bildgebung - *Oversampling*. Überlappende Abtastung: Das Bild nach dem Zusammensetzen der Lichtblätter ist gedehnt. Initialsituation bei der Überabtastung (**Links**) und Justagemöglichkeiten (**Rechts**). Unter den Aufnahmen ist eine kreisförmige Probe (**grün**) und das zusammengesetzte Bild (**rot**) ohne zusätzliche Korrektur gezeigt. Korrekturen der Initialsituation sind über die Veränderung des Spannungsintervalls ΔU (**U-Korr**), der Anzahl der ausgelesenen Lichtblätter (**L-Korr**, Interpolation) oder der Anzahl ausgelesener Kamerapixel je Lichtblatt (**Q-Korr**) möglich. W in [p] ist die Breite des zusammengesetzten Bildes in Pixeln. Die **L**-Lichtblätter sind nach ihrer Breite, die dem, von der Kamera ausgelesenen Anteil entspricht, angeordnet. Die Variation von Q entspricht der Verwendung breiterer oder schmalerer Streifen für die Bildzusammensetzung.

In der Praxis muss ein Kompromiss zwischen Gesamtbelichtungszeit, Feldweite und Auflösung gefunden werden, da die Aufnahmezeit linear mit der Anzahl der Streifen L wächst und bei sinkendem Q zurückgeht. Die Justage erfolgt durch die Reduktion freier Parameter, indem Q festgelegt und das zugehörige Spannungsinkrement U_L ermittelt wird. Da die Spannungsinkremente mit den Winkelinkrementen der Beleuchtung linear verknüpft sind und $U_L \cdot L = \Delta U$ gilt, kann im Anschluss die Feldweite über ΔU gewählt werden. Diese Aufnahmemethode ermöglicht damit die Detektion großer wie auch kleiner Bildausschnitte unter Berücksichtigung der Aufnahmezeit.

Erste Anwendung - Weitfeldfluoreszenzmikroskopie

Um die Funktion der Bildgebung zu prüfen wurden Probeaufnahmen [Abb. 8.10] mit zwei Feinheiten $L = 100$ und $L = 500$ aufgenommen. In beiden Fällen wird bei gleichem ΔU derselbe Raumbereich der Probe gemessen, man verwendet lediglich je Abtastschritt mehr oder weniger Zeilen Q der zentralen Projektion auf dem Kamerasensor. Die Testaufnahmen wurden an der kommerziellen Convallaria-Probe durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine Probe, die für Mikroskopjustagen verwendet wird. Man erkennt, dass eine grobe Abtastung mit $L = 100$ und $Q = 60$ zu Artefakten im Bild führt, die in Abb. 8.8 und Abb. 8.9 erläutert wurden. Die Anpassung an den ausgewählten Raumbereich mit $L = 500$ und $Q = 12$ ergibt dagegen ein Bild ohne sichtbare Übergänge zwischen den Lichtblättern.

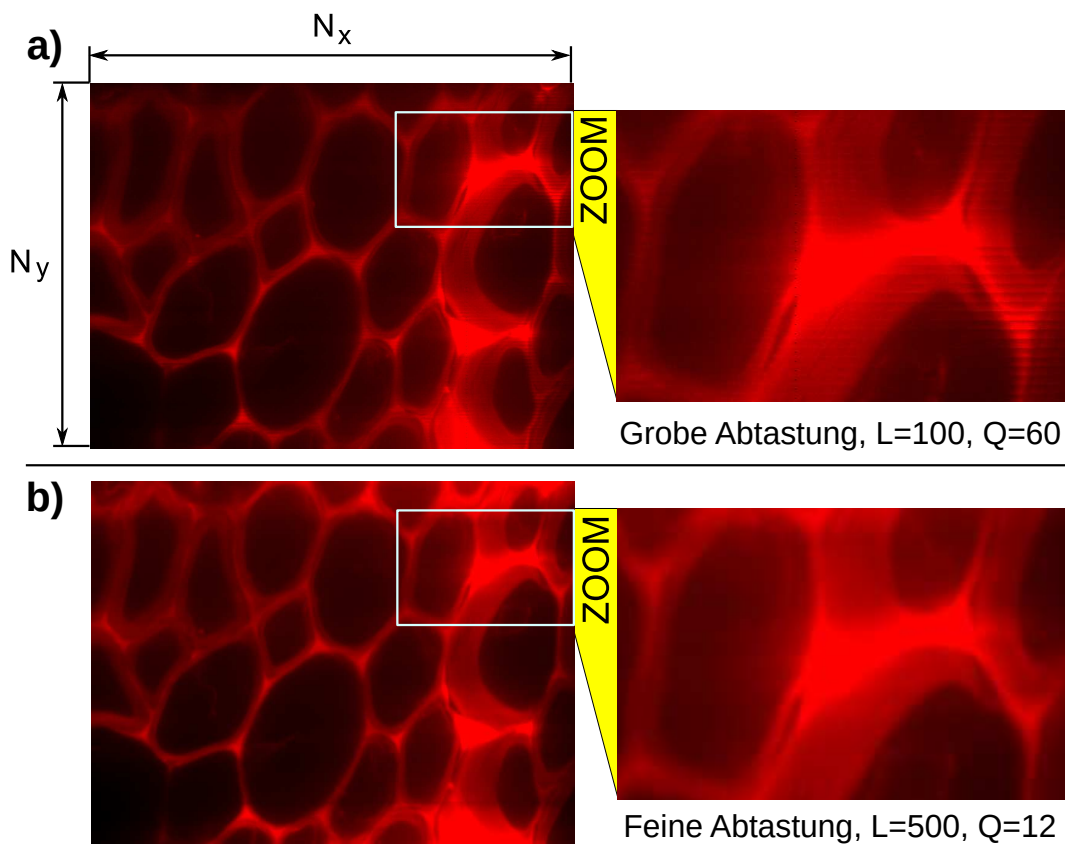


Abbildung 8.10.: Streifenweise zusammengesetzte Fluoreszenzaufnahme der Convallaria-Probe ohne Schlitzblende. Beispielaufnahme einer üblicherweise für Mikroskoptests verfügbaren fluoreszenten Convallaria-Probe mit verschiedenen ausgelesenen Lichtblattpixeln Q und Anzahl Lichtblätter L . **a)** Grobe Abtastung mit $L=100$ und $Q=60$. **b)** Feine Abtastung mit $L=500$ und $Q=12$. Um von der Feinheit unabhängig den gemessenen Ausschnitt der Probe gleich zu lassen, muss $N_y = L \times Q$ konstant gehalten werden. Hier wird sowohl die Q -Korrektur (**Q-Korr**) wie auch die L -Korrektur (**L-Korr**) angewendet. Während bei der groben Abtastung im **ZOOM** deutliche Artefakte zu sehen sind, ist die Darstellung bei $L = 500$ in der **ZOOM**-Darstellung kontinuierlich. N_x ist bei der Abbildung durch die Höhe des Lichtblatts $h_{\text{sheet}}^{\text{det}}$ gegeben. Diese Aufnahme ist ohne Schlitzblende (*pinslit*) entstanden, die Tiefendiskriminierung des Mikroskops ist hier somit die eines gewöhnlichen Epifluoreszenzmikroskops.

Teil IV.

Zusammenfassung und Ausblick

Wesentliche Ergebnisse und zukünftige Projekte

Die quantitative Untersuchung lebender Systeme stellt für die Forschung durch die Vielfalt an relevanten Zeit- als auch Längenskalen eine besondere Herausforderung dar. Die Grundannahme, dass generische Eigenschaften von Organismen sich durch Fluktuationen bestimmter Messgrößen zeigen, hat in der Vergangenheit zu großen Erfolgen in der biophysikalischen Forschung geführt. Dieses Prinzip anwendend wurden in dieser Arbeit durch die Prüfung verschiedener Sensoren und Stressszenarien an *in vivo*-Fluiden als auch durch die Entwicklung eines neuen Mikroskops Grundlagen für zukünftige Projekte gelegt, die der Aufdeckung intrazellulären Lebens gewidmet sind.

In diesem Teil der Arbeit werden die wesentlichen Resultate der *in vivo*-Stressmessungen in lebenden Zellen als auch der Entwicklungsstand des Mikroskops zusammengefasst und diskutiert. In diesem Zusammenhang wird auch aufgezeigt, in welcher Weise die bisherigen Experimente zu zukünftigen Projekten beigetragen haben, einige ausstehende Experimente vorgeschlagen und auf offene Fragen eingegangen.

9.1. Viskositätssensitiver Stresssensor - DASPMI

Die Untersuchungen am molekularen Rotor DASPMI zeigen sowohl dessen möglichen Einsatz als *screening*-Agent für Mitochondrien, als auch seine hinreichende Spezifität zur Zellkompartimentseparation bei physiologischen HeLa-Zellen. Da der Sensor aber eine sehr komplexe Relaxationskinetik hat und konträr auf polare und viskose Mikroumgebungen reagiert, sinkt dessen Spezifität bezüglich der Lebenszeitfraktion. Die Prüfung eines weiteren molekularen Rotors, 4,4'-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, in der Publikation von Kuimova et al.^[203] kurz **(1)** genannt, könnte interessant sein und in Kombination mit der *Phasor-Slicing*-Methode spezifischer auf die lokale Mikroviskosität reagieren als DASPMI, da es **[(1)]** lediglich einen Rotationsfreiheitsgrad hat. Die Schwierigkeit bei der Kompartimentseparation über *Phasor-Slicing* ist nämlich nicht nur durch den geringen Unterschied der mittleren Fraktionsverschiebung in Abhängigkeit von der Mikroumgebung gegeben, sondern liegt auch an der Breite dieser Fraktionsverteilungen. Durch die Verringerung der Freiheitsgrade des jeweiligen mole-

kularen Rotors ist daher eine bessere Auflösbarkeit aufgrund geringerer Streuung der mittleren Fraktionsverschiebungen zu erwarten. Allerdings ist der erwähnte molekulare Rotor stark hydrophob, was die Färbung der Zellen in einem hydrophilen Milieu deutlich erschwert. Mikroinjektionsverfahren^[204] könnten aber die Färbung trotzdem ermöglichen.

Die Phasordarstellung bildet bei einem molekularen Rotor ohne signifikante Fluoreszenzlöschung mit charakteristischen Lebenszeiten jede Komposition der Lebenszeiten entlang einer Linie, der Regressionsgerade, ab. Weist man den Positionen entlang dieser Linie verschiedene zelluläre Zustände zu, ist es möglich von der Position auf der Verbindungslinie auf den zellulären Zustand zu schließen. Auf diese Weise könnte eine Eichung des physiologischen zellulären Zustands erfolgen. Wenn beispielsweise über physiologische Zellen ein Bereich $\lambda_{\min} < \lambda < \lambda_{\max}$ einer mittleren Viskosität von $\Gamma \approx 1 \text{ mPas}$ zugeordnet wird, kann bei anderen Zellen das Auftreten von λ in dem zugewiesenen Bereich Auskunft über deren räumlich verteilte Viskosität geben. Dieses Beispiel bezieht sich auf viskositätssensitive molekulare Rotoren, und spiegelt bei speziell polaritätssensitiven oder *Crowding*-sensitiven Rotoren die jeweilige Einflussgröße nach der Eichung wider.

9.2. Redoxsensitiver Stresssensor - CellRox-DeepRed

Die Untersuchung des Redox-Sensors CellRox-DeepRed ergab, dass der Sensor auf oxidative Stresszunahme mit einer Lebenszeiterhöhung reagiert, auch wenn diese Reaktion nur in HeLa-Zellen nachgewiesen werden konnte. Die herstellerseitig angegebene Observable, die Intensitätszunahme unter oxidativer Stresserhöhung, konnte sowohl in HeLa- als auch U2OS-Zellen bestätigt werden. Auch dieser Effekt war in U2OS-Zellen schwächer ausgeprägt als in HeLa-Zellen, erlaubt aber zukünftige Eichmessungen, falls der oxidative Stresszustand der Zelle über ein zusätzliches Verfahren ermittelt werden kann.

Das Ergebnis der Zellensemble-Phasor-Auswertung wirft die Frage auf, ob CellRox-DeepRed einen molekularen Rotorcharakter hat, da über diese Methode in Menadion-behandelten HeLa-Zellen eine Population von Lebenszeiten beobachtet werden konnte, die für die Lebenszeitverschiebungen im Mittel verantwortlich gemacht werden kann und in unbehandelten HeLa-Zellen nicht auftrat. Diese Vermutung könnte durch Messungen in Lösungen mit verschiedenen Viskositäten, aber gleicher Konzentration freier Sauerstoffradikale gegengeprüft werden, da die Freiheitsgrade der Relaxation molekularer Rotoren durch die Umgebungviskosität beeinflusst werden.

Wenn andererseits die dreieckige Phasorverteilung von CellRox-DeepRed in Menadion-behandelten HeLa-Zellen auf einen dreifachexponentiellen Zerfall des Farbstoffes hinweist, muss dies über ein deutlich größeres Zellensemble $N_{\text{cell}} \approx 500$ überprüft werden, da dreifachexponentielle Histogrammzerfälle in das Innere eines Phasor-Dreiecks fallen und für eine sichere Aussage die Fläche des Phasor-Dreiecks ausgefüllt sein sollte^{[85] [86]}.

9.3. Crowding-Sensor - fCrH2

Der *Crowding*-Sensor fCrH2 ist von allen untersuchten Sensoren der Zuverlässigste. Er reagiert sowohl im Nukleoplasma als auch im Zytoplasma spezifisch auf die Erhöhung zellulären osmotischen Stresses. Für die intrazelluläre Unterscheidung kompartiment-spezifischer Gedrängtheit im gleichen Behandlungszustand reicht die Spezifität bei kleinen Ensemblegrößen nicht aus. Die Mittelwerte der FRET-Effizienzen im Nukleoplasma und Zytoplasma zeigen aber das bekannte qualitative Verhalten, nämlich dass das Nukleoplasma tendenziell weniger gedrängt ist als das Zytoplasma. Eine Eichung der Gedrängtheit über den Anomalieparameter α mit der FRET-Effizienz ist möglich. Hierfür müssen FCS-Messungen mit niedrigen Zählraten $R_{\text{det}} \approx 1 \times 10^4 - 2 \times 10^4 \frac{\text{counts}}{\text{s}}$ in Lösungen mit *Crowding*-Reagenzien wie Dextran^[205] oder Ficoll^[206] durchgeführt werden, um die Laborzeit-Ankunftszeitvektoren zusätzlich zu den vorgestellten Methoden mittels Autokorrelationsfunktionen auswerten zu können.

Da für die gemessenen FRET-Effizienzen in allen Fällen $E_{\text{FRET}} < 50\%$ gilt, wird geschlossen, dass die Fähigkeit des Sensors, hyperosmotischen Stress nachzuweisen bei dem Osmolaritätsunterschied $\Delta c_{\text{osm}} = 0.5 \text{ Osm}$ nicht ausgereizt ist und Messungen mit höheren Osmolaritäten auch im Rahmen zukünftiger Eichmessungen möglich sind.

Sowohl Cisplatin als auch ROS können DNA-Quervernetzungen verursachen. Zukünftige Untersuchungen an Cisplatin-behandelten oder oxidativem Stress ausgesetzten Zellen mit transfiziertem fCrH2 könnten dazu beitragen, den Einfluss der Quervernetzung auf die Gedrängtheit der nukleoplasmischen Region einschließlich der Nukleoli zu quantifizieren.

9.4. Invertierte Lichtblattmikroskopie und Rauschanalyse

Im Rahmen des Mikroskopprojektes wurde zusätzlich zur Planung, dem Einkauf sämtlicher Komponenten und dem Aufbau eine Vorjustage für die Bildgebung durchgeführt. Da der verwendete PMT mit der sehr großen Detektorfläche von $A_{\text{det}} \approx 20 \text{ mm}^2$ sehr sensitiv auf Umgebungslicht wie den Computermonitor oder auch Betriebsleuchten von Geräten reagierte, musste der Aufbau spaltfrei eingehaust werden. Mit Hilfe der Einhausung konnte die Dunkelzählrate des PMT von $R_{\text{det}} \approx 5 \times 10^4 \frac{\text{counts}}{\text{s}}$ auf $R_{\text{det}} \approx 1 \times 10^2 \frac{\text{counts}}{\text{s}}$ reduziert werden. Elementare Steuerungsfunktionen wie die Galvanometer-Kamera-Synchronisation zur Bildaufnahme wie auch die kontinuierliche Aufnahme von Fluoreszenzzeitreihen und Echtzeit-Autokorrelationsberechnung wurden in LabView implementiert. Nach ersten Testmessungen zur Bildgebung [Abb. 8.10] wurde der Aufbau an Adal Sabri übergeben. Zwischenzeitlich ist die Implementierung von FCS-Messungen und Justage der Weitfeldfluoreszenzaufnahmen abgeschlossen und die Erweiterung auf die Messung räumlicher Kreuzkorrelationen [PCF] in Arbeit.

Eine sinnvolle Erweiterung des Aufbaus wäre ein Femtosekunden-Laser mit der Wellenlänge $\lambda_{\text{ex}} \approx 1 \mu\text{m}$, der die Zweiphotonenanregung im Zentrum des Beleuchtungsvolumens ermöglichen und die komplizierte Justage der Schlitzblende redundant machen würde^[207]. Mit Hilfe der Zweiphotonenmikroskopie sind alle üblichen spektroskopischen Verfahren wie FCS^[208], PCF und die Fluoreszenzmikroskopie zugänglich. Vor dem Einsatz eines solchen Lasers müssten allerdings Untersuchungen mit KurzzeitpulsLasern am AOD durchgeführt werden, da die Dispersion am modulierten TeO_2 -Kristall bei ultrakurzen Laserpulsen nicht vernachlässigbar ist. Die Veröffentlichung von Ngoi et al.^[189] befasst sich mit Möglichkeiten der Dispersionskorrektur im Zusammenhang mit akustooptischen Ablenkungssystemen.

Frühere FRAP-Experimente an einzelnen mitochondrialen Strängen zeigten, dass diese, obwohl sie in der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung verbunden scheinen, nicht zwingend in Kommunikation stehen müssen. Hierfür wurden einzelne Enden mitochondrialer Strukturen gezielt gebleicht. Die Konnektivität dieser Strukturen könnte in Zukunft ebenfalls durch PCF-Experimente aufgedeckt werden. Das mitochondriale Netzwerk ist bekannt für seine Fusions- und Fissionsdynamik^[12], die sich jedoch durch übliche Bildgebungsmethoden nicht auf kurzen Zeitskalen prüfen lässt. Dies liegt unter anderem daran, dass einzelne Mitochondrien als relativ große Organellen mit einem Durchmesser von $D_{\text{mito}} \approx 200 \text{ nm}$ nicht wesentlich von der brownischen Molekularbewegung betroffen sind.

Eine Arbeit von Pawar et al.^[209] befasst sich mit der Anisotropie der Diffusion entlang und senkrecht zur Mitosespindel. Sie fanden mit Hilfe von FCS-Messungen, dass die Diffusion entlang der Spindel gegenüber der Querrichtung bevorzugt wird. Die Mitosespindel könnte über PCF näher auf die Kommunikationswege individueller Proteine untersucht werden, da FCS nur lokale Aussagen ermöglicht.

Höchstauflösende Mikroskopietechniken (*superresolution microscopy*) wie PALM (*photoactivated localization microscopy*)^[210] und STORM (*stochastic optical reconstruction microscopy*)^[211] werden für die Analyse fixierter Zellen verwendet und ermöglichen Auflösungen unterhalb der Beugungsgrenze. Diese Methoden umgehen die Beugungsbegrenzung, indem nur sehr wenige Fluorophore angeregt werden, wodurch der Überlapp mehrerer PSF vermeiden wird. Das stochastische Blinken einzelner Fluorophore erfordert jedoch sehr viele Bildaufnahmen. Deshalb ist sowohl die Aufnahmezeit als auch die Rekonstruktion der Fluorophorpositionen über Fitalgorithmen sehr zeitaufwändig. Im Zusammenhang mit höchstauflösenden Mikroskopietechniken kann zukünftig SOFI an diesem Mikroskop realisiert werden. Bei dieser Methode werden viele Fluoreszenzbilder einer mit Quantendots gefärbten Probe aufgenommen und für jeden Pixel die zeitabhängigen Kumulanten verschiedener Ordnungen berechnet. Je höher die gewählte Kumulantenordnung umso höher die Auflösungsverbesserung. Das Integral über diese pixelweisen Kumulanten ergibt dann das fertige SOFI-Bild. Für diese Mikroskopiemethode ist die schnelle Bildgebung hilfreich und erhöht das SNR des SOFI-Bildes. Die Lichtblattbeleuchtung eignet sich sehr gut als Bildgebungsmethode für SOFI, da mit

ihr Aufnahmeraten bis zu $R_{\text{read}} = 5000$ fps möglich sind.

Das beschriebene Mikroskop bietet für viele spektroskopische Anwendungen eine Plattform und ist frei erweiterbar. Im Rahmen der Transportquantifizierung erlaubt es die Messung von normaler, anomaler, isotroper und anisotroper Diffusion wie auch intrazellulärer Strömungen.

Teil V.

Appendix

Geräte

Komponenten zur Strahlerzeugung und Ablenkung wie auch Detektion, sind in diesem Abschnitt aufgeführt. Ein spektral sehr schmalbandiger Laser der Firma Cobolt, AOD und Zubehör von Pegasus Optik/AA Optoelectronics, Galvanometer mit Zubehör von Cambridge Technology und Detektion über Kamera und PMT von Andor bzw. Hamamatsu bilden die Grundlage des Erzeugungs-Detektions bzw Ablenkungssystems des Mikroskops. Thorlabs lieferte die über Software steuerbare XY-Stage inklusive Steuerungseinheit.

Cobolt

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Bezug
DPSS Laser, 50 mW	Calypso-491	Laser
Laserkühlkörper	HS-01	Laser

Cambridge Technology

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Bezug
Galvanometer	6215HSM40	GM
Controller MikroMax	671XX	GM
Scan-Spiegel	6M2106X40S100V1	GM

Pegasus Optik

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Bezug
Akustooptischer Deflektor	AA.DTSX-250-488RS	AOD
Elektronischer Oszillator	AA.DRFA10Y-B-0-60.150	AOD
Elektronischer Verstärker	AA.AMPA-B-34-20.425	AOD

Andor Technology

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Bezug
sCMOS Kamera	DC-152Q-FI	Kamera

Hamamatsu Photonics

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Bezug
Photomultiplier	H7421-40	PMT
Netzteil	C8137	PMT

Thorlabs

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Bezug
X-Y Scanning Stage	MLS203-1	X-Y Stage
Motor Controller für Stage	BBD202	X-Y Stage

Optische Komponenten

Optische Komponenten wie Objektiv, Filter, Spiegel und Linsen wurden von den Firmen Leica, Thorlabs, Laser 2000, Newport und Semrock je nach Verfügbarkeit und Kompatibilität verwendet. Dabei wurden im Anregungspfad Plankonvexlinsen und im Detektionspfad plankonvexe Achromaten eingesetzt. Genauso wurden im Beleuchtungspfad Spiegel mit ca. 97 % Reflektivität bei $\lambda_{\text{ex}} = 491 \text{ nm}$ und im Detektionspfad Breitbandspiegel mit einer mittleren Reflektivität von 99 % verwendet.

Leica Microsystems

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Bezug
Objektiv, 63×1.2	HC PL APO CS $63\times/1.2$ CORR CS2	Objektiv

Laser 2000

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Bezug
Achromat 40 mm, $f = 150 \text{ mm}$	SIG-026-1340	L7

Newport Corporation

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Bezug
Polarisator	10LP-VIS-B	F1
Quarter-Wave-Plate	10RP04-12	F2

Thorlabs

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Bezug
Spiegel 1", 97 %	PF10-03-P01	M1-M5, SM1, SM2
Breitbandspiegel 2", 99 %	BB2-E02	M6-M8
Linse 1", $f = 50$ mm	LA1131-A	L1
Linse 2", $f = 300$ mm	LA1256-A	L2
Linse 2", $f = 200$ mm	LA1979-A	L4
Linse 2", $f = 150$ mm	LA1417-A	L3
Achromat 2", $f = 200$ mm	AC508-200-A	L6, L9, L10
Achromat 2", $f = 100$ mm	AC508-100-A	L5
Achromat 2", $f = 150$ mm	AC508-150-A	L8
Zylinderlinse 1", $f = 50$ mm	LJ1695RM-A	CL1
Zylinderlinse 1", $f = 150$ mm	LJ1629RM-A	CL2
Zylinderlinse 1", $f = 200$ mm	LJ1653RM-A	CL3

Semrock

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Bezug
Breitbandspiegel 1", 99 %	SEM-MM2-311-25.4	SM3
Dichroitischer Strahlteiler	SEM-LPD01-488RS-25	D
Spektraler Bandpass Filter	SEM-FF03-525/50-25	F3, F4

Systemkomponenten

Systemkomponenten haben die Führung des Anregungs- und Detektionsstrahls zur Aufgabe und beinhalten Schienen, Reiter sowie Halter für optische Komponenten. Die Komponenten werden auf einem optischen Tisch mit einem 25×25 mm Lochraster mit M6-Gewindelöchern mittels Inbusschrauben fixiert. Der Großteil der Systemkomponenten wurde von der Firma Owis erworben, die Systemgröße und damit die optische Achshöhe auf $H_{\text{opt}} = 65$ mm festgelegt. Newport lieferte den optischen Tisch und Thorlabs Komponenten für den elektrisch steuerbaren Mikroskopietisch (XY-Stage).

Newport Corporation

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Bezug
Tischplatte, 2400×1500 mm	M-RS2000-58-8	Opt. Tisch
Isolator Standfuß, 600 mm	SL-600-428	Opt. Tisch

Owis

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Bezug
Standard Reiter	RT 65-20-R	SM1-SM3, L1-L10, F1-F4, S
Langlochreiter	RT 65-40-R-LL	M1-M8, D
Verstellbarer Schlitz	SP 60	S
Erhöhter Reiter	RT 65-25-R-H	CL1-CL3
Spiegelhalter	K 50-FGS	M1-M8
Spiegelfassung 1"	SF-D26-D40	M1-M5
Spiegelfassung 2"	SF-D51	M6-M8
Klappspiegelhalter	KSHM 40-LI-MDS	SM1
Klappspiegelhalter	KSHM 40-RE-MDS	SM2, SM3
Adapterplatte für ...	ADP 65B	SM1-SM3
... Klappspiegelhalter		
Transjustierung	TRANS 65L-D35-FGS	D, L1
Transjustierung	TRANS 65L-D45-FGS	L7
Fassung für Optik	G35-13-D25	L1
Fassung für Optik	G45-20-D40	L7
Reduziereinsatz	EINSD35/25	D
Drehfassung SYS 40	DOH 40-D26	CL1-CL3, F1-F2
Adapterplatte Drehfassung	ADP-S65-S40-20	CL1-CL3, F1-F2
Halter für Trans-Optik 1"	OH 65-D25	L2
Halter für Trans-Optik 2"	OHU 65-D50	L3-6, L8-L10
130 mm Schiene	S65-130-LL	F1
200 mm Schiene	S65-200-LL	M7, M8
300 mm Schiene	S65-300-LL	M1, M3
400 mm Schiene	S65-400-LL	L3
500 mm Schiene	S65-500-LL	L1, L9
700 mm Schiene	S65-700-LL	CL1, D
Lochblende 30 µm	LB 30-D5-G25	P
Goniometer	TP 65-W30-W40	AOD
Adapterplatte Goniometer	ADP 65B	AOD

Thorlabs

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Bezug
Slide Holder für Stage	MLS203P2	X-Y Stage
Säulenauflage für Stage	MLSA01	X-Y Stage
Lineartisch	LNR25M/M	X-Y Stage
Winkelstück für Stage	LNR25P2	X-Y Stage
Winkelstück für Beleuchtung	AP90/M	X-Y Stage
Grundplatte für Lineartisch	LNR25P1	X-Y Stage

Teil VI.

Register

Literaturverzeichnis

- [1] STIEHL, OLIVIA: *On the crowding state of cellular and biomimetic fluids*. Dissertation, Universität Bayreuth, 2017.
- [2] HARTL, F. ULRICH: *Cellular Homeostasis and Aging*. Annual Review of Biochemistry, 85(1):1 – 4, 2016.
- [3] HANCOCK, EDWARD J., JORDAN ANG, ANTONIS PAPACHRISTODOULOU und GUY-BART STAN: *The Interplay between Feedback and Buffering in Cellular Homeostasis*. Cell Systems, 5:498 – 508.e23, 11 2017.
- [4] B., ALBERTS, JOHNSON A. und LEWIS J.: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 2002.
- [5] WAWREZINIECK, L., H. RIGNEAULT, D. MARGUET und P.-F. LENNE: *Fluorescence Correlation Spectroscopy Diffusion Laws to Probe the Submicron Cell Membrane Organization*. Biophysical Journal, 89(6):4029 – 4042, 2005.
- [6] RICHARDSON, J.S. und D.C. RICHARDSON: *Doing Molecular Biophysics: Finding, Naming, and Picturing Signal Within Complexity*. Annual Review of Biophysics, 42(1):1 – 28, 2013.
- [7] PINCET, F., V. ADRIEN, R. YANG, J. DELACOTTE, J. E. ROTHMAN, W. URBACH und D. TARESTE: *FRAP to Characterize Molecular Diffusion and Interaction in Various Membrane Environments*. PLoS ONE, 11(7), 2016.
- [8] WEISS, MATTHIAS: *Challenges and artifacts in quantitative photobleaching experiments*. Traffic Copenhagen Denmark, 5(9):662 – 671, 2004.
- [9] TSACHAKI, MARIA, JULIA BIRK, AURÉLIE EGERT und ALEX ODERMATT: *Determination of the topology of endoplasmic reticulum membrane proteins using redox-sensitive green-fluorescence protein fusions*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1853(7):1672 – 1682, 2015.
- [10] FERENCZ, CSILLA-MARIA, GERNOT GUIGAS, ANDREAS VERES, BRIGITTE NEUMANN, OLAF STEMMANN und MATTHIAS WEISS: *In Vitro Reconstitution of the Endoplasmic Reticulum*. Current Protocols in Cell Biology, 76(1):11.22.1 – 11.22.16, 09 2017.
- [11] FERENCZ, CSILLA-MARIA, GERNOT GUIGAS, ANDREAS VERES, BRIGITTE NEUMANN, OLAF STEMMANN und MATTHIAS WEISS: *Shaping the endoplasmic reticulum in vitro*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1858(9):2035 – 2040, 2016.

- [12] ZAMPONI, NAHUEL, EMILIANO ZAMPONI, SERGIO A. CANNAS, ORLANDO V. BILLONI, PABLO R. HELGUERA und DANTE R. CHIALVO: *Mitochondrial network complexity emerges from fission/fusion dynamics*. Scientific Reports, 8(1), 2018.
- [13] SANTI, PETER A: *Light Sheet Fluorescence Microscopy: A Review*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 59(2):129 – 138, 02 2011.
- [14] BLOM, HANS und JERKER WIDENGREN: *Stimulated Emission Depletion Microscopy*. Chemical Reviews, 117(11):7377 – 7427, 2017.
- [15] STIEHL, OLIVIA, ANDREAS VERES und MATTHIAS WEISS: *Monitoring Subcellular Stress Response via a Cell-permeant Rotor Dye*. Journal of Fluorescence, 28(2):605 – 613, 03 2018.
- [16] RIVAS, GERMAN und ALLEN P. MINTON: *Macromolecular Crowding In Vitro, In Vivo, and In Between*. Trends in Biochemical Sciences, 41(11):970 – 981, 2016.
- [17] SCHWILLE, PETRA und ELKE HAUSTEIN: *Fluorescence Correlation Spectroscopy - An Introduction to its Concepts and Applications*, 01 2001.
- [18] HINDE, E., F. CARDARELLI, M. A. DIGMAN und E. GRATTON: *In vivo pair correlation analysis of EGFP intranuclear diffusion reveals DNA-dependent molecular flow*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(38):16560 – 16565, 2010.
- [19] DERTINGER, THOMAS, RYAN COLYER, ROBERT VOGEL, MIKE HEILEMANN, MARKUS SAUER, JOERG ENDERLEIN und SHIMON WEISS: *Superresolution Optical Fluctuation Imaging (SOFI)*, Seiten 17 – 21. Springer Netherlands, Dordrecht, 2012.
- [20] DERTINGER, T., R. COLYER, G. IYER, S. WEISS und J. ENDERLEIN: *Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI)*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(52):22287 – 22292, 2009.
- [21] ZOU, LIMIN, SU ZHANG, BAOKAI WANG und JIUBIN TAN: *High-order super-resolution optical fluctuation imaging based on low-pass denoising*. Optical Letters, 43(4):707 – 710, 02 2018.
- [22] GEISSBUEHLER, STEFAN, NOELIA L. BOCCHIO, CLAUDIO DELLAGIACOMA, CORINNE BERCLAZ, MARCEL LEUTENEGGER und THEO LASSER: *Mapping molecular statistics with balanced super-resolution optical fluctuation imaging (bSOFI)*. Optical Nanoscopy, 1(1):1 – 4, 04 2012.
- [23] <http://www.wikimedia.org>.
- [24] FELS, J., S. N. ORLOV und R. GRYGORCZYK: *The Hydrogel Nature of Mammalian Cytoplasm Contributes to Osmosensing and Extracellular pH Sensing*. Biophysical Journal, 96(10):4276 – 4285, 2009.
- [25] M., WEISS, ELSNER M., KARTBERG F. und NILSSON T.: *Anomalous Subdiffusion is a Measure for Cytoplasmic Crowding in Living Cells*. Biophysical Journal, 87(5):3518 – 3524, 2004.
- [26] ZHOU, H.-X., G. RIVAS und A. P. MINTON: *Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences*. Annual Review of Biophysics, 37:375 – 397, 2008.
- [27] DIX, JAMES A. und A.S. VERKMAN: *Crowding Effects on Diffusion in Solutions and Cells*. Annual Review of Biophysics, 37(1):247 – 263, 2008.
- [28] HAVLIN, SHLOMO und DANIEL BEN-AVRAHAM: *Diffusion in disordered media*. Advances in Physics, 36, 1987.

-
- [29] WANG, K G: *Long-range correlation effects, generalized Brownian motion and anomalous diffusion*. Journal of Physics A: Mathematical and General, 27(11):3655, 1994.
- [30] BUSELMEIER, WERNER: *Biologie für Mediziner*. Springer, 2007.
- [31] LUBY-PHELPS, K.: *The physical chemistry of cytoplasm and its influence on cell function: an update*. Molecular Biology of the Cell, 24(17):2593 – 2596, 2013.
- [32] NIKOLAISEN, JULIE, LINN I. H. NILSSON, INA K. N. PETTERSEN, PETER H. G. M. WILLEMS, JAMES B. LORENS, WERNER J. H. KOOPMAN und KARL J. TRONSTAD: *Automated Quantification and Integrative Analysis of 2D and 3D Mitochondrial Shape and Network Properties*. PLoS ONE, 2014.
- [33] HATCH, ANNA L., PINAR S. GUREL und HENRY N. HIGGS: *Novel roles for actin in mitochondrial fission*. Journal of Cell Science, 127(21):4549 – 4560, 2014.
- [34] BENARD, GIOVANNI, NADÈGE BELLANCE, CAROLINE JOSE und RODRIGUE ROSSIGNOL: *Mitochondrial Dynamics and Neurodegeneration*. Springer, 05 2011.
- [35] THANNICKAL, VICTOR J. und BARRY L. FANBURG: *Reactive oxygen species in cell signaling*. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology, 279(6):1005 – 1028, 2000.
- [36] BRATIC, ANA und NILS-GÖRAN LARSSON: *The role of mitochondria in aging*. The Journal of Clinical Investigation, 123(3):951 – 957, 3 2013.
- [37] H., CHEN und CHAN DC: *Mitochondrial dynamics—fusion, fission, movement, and mitophagy—in neurodegenerative diseases*. Human Molecular Genetics, 18, 2009.
- [38] RAINEY, MICHAEL D., HUONG QUACHTHITHU, DAVID GABORIAU und CORRADO SANTO-CANALE: *DNA Replication Dynamics and Cellular Responses to ATP Competitive CDC7 Kinase Inhibitors*. ACS Chemical Biology, 12(7):1893 – 1902, 2017.
- [39] F., CARDARELLI und GRATTON E.: *In Vivo Imaging of Single-Molecule Translocation Through Nuclear Pore Complexes by Pair Correlation Functions*. PLoS ONE, 5(5), 2010.
- [40] D., CMARKO, SMIGOVA J., MINICHOVA L. und POPOV A.: *Nucleolus: the ribosome factory*. Histology and Histopathology, 23(10):1291 – 1298, 10 2008.
- [41] HAKEN, HERMANN und HANS CHRISTOPH WOLF: *Molekülphysik und Quantenchemie*. Springer, 2006.
- [42] SCHWARTZ, STEPHEN E.: *The Franck-Condon principle and the duration of electronic transitions*. Journal of Chemical Education, 50(9):608, 1973.
- [43] COMBS, C. A.: *Fluorescence Microscopy: A Concise Guide to Current Imaging Methods*. Current Protocols in Neuroscience, 2:1934 – 8584, 2010.
- [44] <http://www.ltb-berlin.de>.
- [45] PHILIP, J. und K. CARLSSON: *Theoretical investigation of the signal-to-noise ratio in fluorescence lifetime imaging*. Optical Society of America, 20(2):368 – 379, 2003.
- [46] MY, BEREZIN und ACHILEFU S: *Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging*. Chemical Reviews, 110(5):2641 – 2684, 2010.

- [47] STERN, OTTO und MAX VOLMER: *Über die Abklingungszeit der Fluoreszenz (The extinction period of fluorescence)*. Physikalische Zeitschrift, 20:183 – 188, 1919.
- [48] GAVIOLA, E.: *Die Abklingungszeiten der Fluoreszenz von Farbstofflösungen*. Zeitschrift für Physik, 35(10):748 – 756, 1926.
- [49] DAY, RICHARD N.: *Measuring Protein Interactions Using Förster Resonance Energy Transfer and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*. Microscopy and Microanalysis, 20(S3):2130 – 2131, 2014.
- [50] ALBANI, JIHAD RENE: *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*. Wiley, 2008.
- [51] MARIA-CHANTAL, CHIRIO-LEBRUN und PRATS MICHEL: *Fluorescence resonance energy transfer (FRET): Theory and experiments*. Biochemistry and Molecular Biology Education, 26(4):320 – 323, 1998.
- [52] ZHANG, JIANG-MIN: *Fermi's golden rule: its derivation and breakdown by an ideal model*. 04 2016.
- [53] JONKMAN, JAMES und CLAIRE M. BROWN: *Any Way You Slice It—A Comparison of Confocal Microscopy Techniques*. Journal of Biomolecular Techniques, 26(2):54 – 65, 2015.
- [54] OREOPOULOS, JOHN, RICHARD BERMAN und MARK BROWNE: *Spinning-disk confocal microscopy: present technology and future trends*. 123C:153 – 175, 06 2014.
- [55] WEBB, DONNA J. und CLAIRE M. BROWN: *Epi-Fluorescence Microscopy*. Methods in molecular biology, 931:29 – 59, 2013.
- [56] WEI, WEI, SHANGLIAN HUANG, NING WANG, ZHU JIN, JIE ZHANG und WEIMIN CHEN: *A Near-Infrared Spectrometer Based on Novel Grating Light Modulators*. 9:3109 – 3121, 04 2009.
- [57] WONG, JENSEN J. H., SARA K. WRIGHT, IRENE GHOZALLI, RAJNI MEHRA, KENJI FURUYA und DERRICK S. KATAYAMA: *Simultaneous High-Throughput Conformational and Colloidal Stability Screening Using a Fluorescent Molecular Rotor Dye, 4-(4-(Dimethylamino)styryl)-N-Methylpyridinium Iodide (DASPMI)*. Journal of Biomolecular Screening, 21(8):842 – 850, 2016.
- [58] HAIDEKKER, MARK A. und EMMANUEL A. THEODORAKIS: *Environment-sensitive behavior of fluorescent molecular rotors*. Journal of Biological Engineering, 4(1):11, 2010.
- [59] R., RAMADASS und BEREITER-HAHN J.: *How DASPMI reveals mitochondrial membrane potential: fluorescence decay kinetics and steady-state anisotropy in living cells*. Biophysical Journal, 95(8):4068 – 4076, 2008.
- [60] ASCHI M. AND, BARONE V., CARLOTTI B., DAIDONE I., ELISEI F. und AMADEI A.: *Photoexcitation and relaxation kinetics of molecular systems in solution: towards a complete in silico model*. Physical Chemistry Chemical Physics, 18(41):28919 – 28931, 2016.
- [61] RAMADASS, RADHAN: *The behavior of DASPMI in living cells: spectrally and spatially resolved fluorescence lifetime imaging*. Dissertation, Goethe Universität, 2008.
- [62] KRAMER, P. A., S. RAVI, B. CHACKO, M. S. JOHNSON und V. M. DARLEY-USMAR: *A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: Implications for their use as bioenergetic biomarkers*. Redox Biology, 2:206 – 210, 2014.
- [63] JOHNSON, MATTHEW P.: *Photosynthesis*. Essays in Biochemistry, 60(3):255 – 273, 2016.

-
- [64] THERMO FISCHER: *Shedding light on oxidative stress*, 04 2011. www.thermofischer.com.
- [65] MAHER, JOHN F.: *Principles of dialysis and dialysis of drugs*. The American Journal of Medicine, 62(4):475 – 481, 1977.
- [66] TOUATI, KHALED und THOMAS SCHIESTEL: *Evaluation of the Potential of Osmotic Energy as Renewable Energy Source in Realistic Conditions*. Energy Procedia, 42:261 – 269, 2013.
- [67] GNUTT, DAVID, MIMI GAO, OLIVER BRYLSKI, MATTHIAS HEYDEN und SIMON EBBINGHAUS: *Excluded Volume Effects in Living Cells*. Angewandte Chemie International Edition, 54(8):2548 – 2551, 2015.
- [68] CHRISTIANSEN, ALEXANDER und PERNILLA WITTUNG-STAFSHED: *Quantification of Excluded Volume Effects on the Folding Landscape of Pseudomonas aeruginosa Apoazurin In Vitro*. Biophysical Journal, 105(7):1689 – 1699, 2013.
- [69] MOURAO, MARCIO A., JOE B. HAKIM und SANTIAGO SCHNELL: *Connecting the Dots: The Effects of Macromolecular Crowding on Cell Physiology*. Biophysical Journal, 107(12):2761 – 2766, 2014.
- [70] SHRESTHA, D., A. JENEI, P. NAGY, G. VEREB und J. SZÖLLÖSI: *Understanding FRET as a Research Tool for Cellular Studies*. International Journal of Molecular Sciences, 16(4):6718 – 6756, 2015.
- [71] BOERSMA, A., I. ZUHORN und B. POOLMAN: *A Sensor for Quantification of Macromolecular Crowding in Living Cells*. Nature Methods, 12(3):227 – 229, 2015.
- [72] LAKOWICZ, JOSEPH R. (Herausgeber): *Frequency-Domain Lifetime Measurements*, Seiten 157 – 204. Springer, 2006.
- [73] VERVEER, PETER J., ANTHONY SQUIRE und PHILIPPE I.H. BASTIAENS: *Global Analysis of Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy Data*. Biophysical Journal, 78(4):2127 – 2137, 2000.
- [74] WAHL, MICHAEL: *Time-Correlated Single Photon Counting*. Technischer Bericht, PicoQuant, 2014.
- [75] O'CONNOR, D. V. und DAVID PHILLIPS: *Time-correlated single photon counting*. Academic Press, 1984.
- [76] TOSI, ALBERTO, ALBERTO DALLA MORA, FRANCO ZAPPA, ANGELO GULINATTI, DAVIDE CONTINI, ANTONIO PIFFERI, LORENZO SPINELLI, ALESSANDRO TORRICELLI und RINALDO CUBEDDU: *Fast-gated single-photon counting technique widens dynamic range and speeds up acquisition time in time-resolved measurements*. Opt. Express, 19(11):10735 – 10746, 05 2011.
- [77] PATTING, MATTHIAS, MICHAEL WAHL, PETER KAPUSTA und RAINER ERDMANN: *Dead-time effects in TCSPC data analysis*. 6583:658307, 05 2007.
- [78] W., BECKER, SU B., HOLUB O. und WEISSHART K.: *FLIM and FCS detection in laser-scanning microscopes: Increased efficiency by GaAsP hybrid detectors*. Microscopy Research and Technique, 74(9):804 – 811.
- [79] W., BECKER: *Fluorescence lifetime imaging – techniques and applications*. Journal of Microscopy, 247(2):119 – 136.
- [80] POWLES, J.G.: *Cole-Cole plots as they should be*. Journal of Molecular Liquids, 56:35 – 47, 1993.

- [81] COLE, KENNETH S. und ROBERT H. COLE: *Dispersion and Absorption in Dielectrics I. Alternating Current Characteristics*. The Journal of Chemical Physics, 9(4):341 – 351, 1941.
- [82] S., RANJIT, LANZANO L. und GRATTON E.: *Mapping Diffusion in a Living Cell via the Phasor Approach*. Biophysical Journal, 107(12):2775 – 2785, 2014.
- [83] DUHAMEL, P. und M. VETTERLI: *Fast fourier transforms: A tutorial review and a state of the art*. Signal Processing, 19(4):259 – 299, 1990.
- [84] STIEHL, OLIVIA und MATTHIAS WEISS: *Heterogeneity of crowded cellular fluids on the meso- and nanoscale*. Soft Matter, 12:9413 – 9416, 2016.
- [85] MALACRIDA, LEONEL, DAVID JAMESON und ENRICO GRATTON: *A multidimensional phasor approach reveals LAURDAN photophysics in NIH-3T3 cell membranes*. 7:9215, 08 2017.
- [86] FEREIDOUNI, FARZAD, ARJEN N. BADER und HANS C. GERRITSEN: *Spectral phasor analysis allows rapid and reliable unmixing of fluorescence microscopy spectral images*. Opt. Express, 20(12):12729 – 12741, 06 2012.
- [87] WATADA, JUNZO: *Kolmogorov-Smirnov Two Sample Test with Continuous Fuzzy Data*, 01 2010.
- [88] B. MANN, HENRY und DONALD R. WHITNEY: *On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other*. 18, 11 1946.
- [89] KIM, T. K.: *T test as a parametric statistic*. Korean Journal of Anesthesiology, 68(6):540 – 546, 2015.
- [90] PASSARELLI, CHIARA, STEFANIA PETRINI, ANNA PASTORE, VALENTINA BONETTO, PATRIZIO SALE, LAURA M GAETA, GIULIA TOZZI, ENRICO BERTINI, MONICA CANEPARI, ROSETTA ROSSI und FIORELLA PIEMONTE: *Myosin as a potential redox-sensor: An in vitro study*. Journal of muscle research and cell motility, 29:119 – 126, 10 2008.
- [91] KHANDELWAL, RADHIKA, ANAND KUMAR SHARMA, SWATHI CHADALAWADA und YOGENDRA SHARMA: *Secretagogin Is a Redox-Responsive Ca²⁺ Sensor*. Biochemistry, 56(2):411 – 420, 2017.
- [92] ABRAHAM, BOBIN GEORGE, VILLE SANTALA, NIKOLAI V. TKACHENKO und MATTI KARP: *Fluorescent protein-based FRET sensor for intracellular monitoring of redox status in bacteria at single cell level*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406(28):7195 – 7204, 2014.
- [93] LUKYANOV, KONSTANTIN A. und VSEVOLOD V. BELOUSOV: *Genetically encoded fluorescent redox sensors*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1840(2):745 – 756, 2014.
- [94] LUCKE, B., H. K. HARTLINE und M. MCCUTCHEON: *Further studies on the kinetics of osmosis in living cells*. The Journal of General Physiology, 14(3):405 – 419, 1931.
- [95] E., CASULA, ASUNI G.P., SOGOS V., FADDA S., DELOGU F. und CINCOTTI A.: *Osmotic behaviour of human mesenchymal stem cells: Implications for cryopreservation*. PLoS ONE, 12(9), 2017.
- [96] STROKA, KIMBERLY M., HONGYUAN JIANG, SHIH-HSUN CHEN, ZIQIU TONG, DENIS WIRTZ, SEAN X. SUN und KONSTANTINOS KONSTANTOPOULOS: *Water Permeation Drives Tumor Cell Migration in Confined Microenvironments*. Cell, 157(3):611 – 623, 09 2017.

-
- [97] YU, WANGIE, YUNYUN CHEN, JULIEN DUBRULLE, FABIO STOSI, VASANTA PUTLURI, ARUN SREEKUMAR, NAGIREDDY PUTLURI, DODGE BALUYA, STEPHEN Y. LAI und VLAD C. SANDULACHE: *Cisplatin generates oxidative stress which is accompanied by rapid shifts in central carbon metabolism*. Scientific Reports, 8(4306), 03 2018.
- [98] TILIGADA, E: *Chemotherapy: induction of stress responses*. Endocrine-Related Cancer, 13(Supplement 1):115 – 124, 2006.
- [99] EGGER, G. und J. DIXON: *Beyond Obesity and Lifestyle: A Review of 21st Century Chronic Disease Determinants*. BioMed Research International, 2014.
- [100] S., BETLEJEWSKI: *Social diseases, civilization diseases or lifestyle diseases?* Wiadomosci Lekarskie, 60(9 - 10):489 – 492, 2007.
- [101] CRIOLLO, ALFREDO, LORENZO GALLUZZI, M. CHIARA MAIURI, EZGI TASDEMIR, SERGIO LAVANDERO und GUIDO KROEMER: *Mitochondrial control of cell death induced by hyperosmotic stress*. Apoptosis, 12(1):3, 10 2006.
- [102] RASHID, RAFI, STELLA MIN LING CHEE, MICHAEL RAGHUNATH und THORSTEN WOHLAND: *Macromolecular crowding gives rise to microviscosity, anomalous diffusion and accelerated actin polymerization*. Physical Biology, 12(3):034001, 2015.
- [103] DASARI, S. und P. B. TCHOUNWOU: *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action*. European Journal of Pharmacology, 740:364 – 378, 2014.
- [104] HUANG, Y. und L. LI: *DNA crosslinking damage and cancer - a tale of friend and foe*. Translational Cancer Research, 2(3):144 – 154, 2013.
- [105] STRINGARI, CHIARA, AMANDA CINQUIN, OLIVER CINQUIN, MICHELLE DIGMAN, PETER DONOVAN und GRATTON ENRICO: *Phasor approach to Fluorescence Lifetime microscopy distinguishes different metabolic states of germ cells in live tissue*. PNAS, 108(33):13582 – 13587, 08 2011.
- [106] CHRISTIANSEN, ERIC M., SAMUEL J. YANG, D. MICHAEL ANDO, ASHKAN JAVAHERIAN, GAIA SKIBINSKI, SCOTT LIPNICK, ELLIOT MOUNT, KEVAN O'NEIL, ALISON SHAH, ALICIA K. LEE, PIYUSH GOYAL, WILLIAM FEDUS, RYAN POPLIN, ANDRE ESTEVA, MARC BERNDL, LEE L. RUBIN, PHILIP NELSON und STEVEN FINKBEINER: *In Silico Labeling: Predicting Fluorescent Labels in Unlabeled Images*. Cell.
- [107] CHALMERS, S., C. D. SAUNTER, J. M. GIRKIN und J. G. MCCARRON: *Flicker-assisted localization microscopy reveals altered mitochondrial architecture in hypertension*. Scientific Reports, 5:16875, 2015.
- [108] DHANACHANDRA, NAMEIRAKPAM, KHUMANTHEM MANGLEM und YAMBEM JINA CHANU: *Image Segmentation Using K-means Clustering Algorithm and Subtractive Clustering Algorithm*. Procedia Computer Science, 54:764 – 771, 2015.
- [109] YANG, ZEJIA, LISA M. SCHUMAKER, MERRILL J. EGORIN, ELEANOR G. ZUHOWSKI, ZHONGMIN GUO und KEVIN J. CULLEN: *Cisplatin Preferentially Binds Mitochondrial DNA and Voltage-Dependent Anion Channel Protein in the Mitochondrial Membrane of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Possible Role in Apoptosis*. 12(19):5817 – 5825, 2006.
- [110] PODRATZ, J. L., A. M. KNIGHT, L. E. TA, N. P. STAFF, J. M. GASS, K. GENELIN und A. J. WINDEBANK: *Cisplatin induced Mitochondrial DNA Damage In Dorsal Root Ganglion Neurons*. Neurobiology of Disease, 41(3):661 – 668, 2011.

- [111] RAMADASS, RADHAN und BEREITER-HAHN JÜRGEN: *Photophysical Properties of DASPMI as Revealed by Spectrally Resolved Fluorescence Decays*. The Journal of Physical Chemistry B, 111(26):7681 – 7690, 2007.
- [112] DIGMAN, MICHELLE, VALERIA CAIOLFA, MORENO ZAMAI und ENRICO GRATTON: *The Phasor Approach to Fluorescence Lifetime Imaging Analysis*. Biophysical Journal, 94(2):L14 – L16, 2008.
- [113] NR, JENA: *DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair*. 37(3):503 – 517, 07 2012.
- [114] BUTNARIU, MONICA: *The Oxygen Paradox*. Journal of Pharmacogenomics and Pharmacoproteomics, 3(1), 2012.
- [115] HAMANAKA, ROBERT B. und NAVDEEP S. CHANDEL: *Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes*. Trends in Biochemical Sciences, 35(9):505 – 513, 2010.
- [116] RISTOW, MICHAEL: *Unraveling the Truth About Antioxidants: Mitohormesis explains ROS-induced health benefits*. Nature medicine, 20:709 – 711, 07 2014.
- [117] CALABRESE, VITTORIO, CAROLIN CORNELIUS, CESARE MANCUSO, RICCARDO LENTILE, A.M. GIUFFRIDA STELLA und D. ALLAN BUTTERFIELD: *Redox Homeostasis and Cellular Stress Response in Aging and Neurodegeneration*, 2010.
- [118] MARENGO, BARBARA, MARIAPAOLA NITTI und ET AL. ANNA LISA FURFARO: *Redox Homeostasis and Cellular Antioxidant Systems: Crucial Players in Cancer Growth and Therapy*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016:1 – 16, 2016.
- [119] ELAHI, MAQSOOD M., YU XIANG KONG und BASHIR M. MATATA: *Oxidative Stress as a Mediator of Cardiovascular Disease*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2(5):259 – 269, 2009.
- [120] POHANKA, MIROSLAV: *Alzheimer's Disease and Oxidative Stress: A Review*. Current Medicinal Chemistry, 21(3):356 – 364, 2014.
- [121] HWANG, O.: *Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease*. Experimental Neurobiology, 22(1):11 – 17, 2013.
- [122] BOKOV, ALEX, ASISH CHAUDHURI und ARLAN RICHARDSON: *The role of oxidative damage and stress in aging*. Mechanisms of Ageing and Development, 125(10):811 – 826, 2004.
- [123] CONKLIN, KENNETH A.: *Chemotherapy-Associated Oxidative Stress: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness*. Integrative Cancer Therapies, 3(4):294 – 300, 2004.
- [124] CHEN, YUMIN, PAIBOON JUNG SUWADEE, MARY VORE, D BUTTERFIELD und DARET CLAIR: *Collateral Damage in Cancer Chemotherapy: Oxidative Stress in Nontargeted Tissues*. 7:147 – 156, 07 2007.
- [125] LEE, Y. S., J.-S. YI, H. R. LIM, T. S. KIM, I. Y. AHN, K. KO und J. LEE: *Phototoxicity Evaluation of Pharmaceutical Substances with a Reactive Oxygen Species Assay Using Ultra-violet A*. Toxicological Research, 33(1):43 – 48, 2017.
- [126] JAROSLAV, ICHA, WEBER MICHAEL, WATERS JENNIFER C. und NORDEN CAREN: *Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it*. BioEssays, 39(8):1700003.

-
- [127] NORDBERG, JONAS und ELIAS S.J. ARNÉR: *Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system*. Free Radical Biology and Medicine, 31(11):1287 – 1312, 2001.
- [128] LU, S. C.: *Glutathione Synthesis*. Biochimica et Biophysica Acta, 1830(5):3143 – 3153, 2013.
- [129] PICKERING, ANDREW M., LESYA VOJTOVICH, JOHN TOWER und KELVIN J. A. DAVIES: *Oxidative stress adaptation with acute, chronic, and repeated stress*. Free Radical Biology and Medicine, 55:109 – 118, 2013.
- [130] MATTEO, LANDRISCINA, MADDALENA FRANCESCA, LAUDIERO GABRIELLA und ESPOSITO FRANCA: *Adaptation to Oxidative Stress, Chemoresistance, and Cell Survival*. Antioxidants & Redox Signaling, 11(11):2701 – 2716, 2009.
- [131] AZIZBEIGI, KAMAL, STEPHEN R. STANNARD, SIRVAN ATASHAK und MARJAN MOSALMAN HAGHIGHI: *Antioxidant enzymes and oxidative stress adaptation to exercise training: Comparison of endurance, resistance, and concurrent training in untrained males*. Journal of Exercise Science and Fitness, 12(1):1 – 6, 2014.
- [132] FREITAS, MARIANA, INÊS BALDEIRAS, TERESA PROENÇA, VERA ALVES, ANABELA MOTA-PINTO und ANA SARMENTO-RIBEIRO: *Oxidative stress adaptation in aggressive prostate cancer may be counteracted by the reduction of glutathione reductase*. FEBS Open Bio, 2:119 – 128, 2012.
- [133] GÖRLACH, A., K. BERTRAM, S. HUDECOVA und O. KRIZANOVA: *Calcium and ROS: A mutual interplay*. Redox Biology, 6:260 – 271, 2015.
- [134] ROSA, ANTONELLA, MONICA DEIANA, VIVIANA CASU, STEFANIA PACCAGNINI, GIOVANNI APPENDINO, MAURO BALLERO und M ASSUNTA DESSÍ: *Antioxidant Activity of Capsinoids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50:7396 – 7401, 12 2002.
- [135] PADAYATTY, SEBASTIAN J., ARIE KATZ, YAOHUI WANG, PETER ECK, ORAN KWON, JE-HYUK LEE, SHENGLIN CHEN, CHRISTOPHER PETER CORPE, ANAND S DUTTA, SUDHIR KUMAR DUTTA und MARK LEVINE: *Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention*. Journal of the American College of Nutrition, 22(1):18 – 35, 2003.
- [136] LUIGI, FRUSCIANTE, CARLI PAOLA, ERCOLANO MARIA R., PERNICE RITA, DI MATTEO ANTONIO, FOGLIANO VINCENZO und PELLEGRINI NICOLETTA: *Antioxidant nutritional quality of tomato*. Molecular Nutrition & Food Research, 51(5):609 – 617.
- [137] PAPAGEORGIOU, C. P.: *Mixed memory Markov models for time series analysis*. In: *Proceedings of the IEEE/IAFE/INFORMS 1998 Conference on Computational Intelligence for Financial Engineering (CIFEr) (Cat. No.98TH8367)*, Seiten 165–170, 03 1998.
- [138] DYSON, FREEMAN: *A meeting with Enrico Fermi*. 427:297, 01 2004.
- [139] LIPSON, STEPHEN G., HENRY S. LIPSON und D.S. TANNHAUSER: *Optik*. Springer Verlag, 2013.
- [140] GAL, NAAMA, DIANA LECHTMAN-GOLDSTEIN und DAPHNE WEIHS: *Particle tracking in living cells: A review of the mean square displacement method and beyond*. 52, 05 2013.
- [141] ZUCKERMAN, DANIEL M.: *Statistical Biophysics Blog: Everything is Markovian; nothing is Markovian*. Scholar Archive, 3957, 2015.

- [142] MBEMBA, FUNDU, ANDRÉE HOUBION, MARTINE RAES und JOSÉ REMACLE: *Subcellular localization and modification with ageing of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in human fibroblasts*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 838(2):211 – 220, 1985.
- [143] CHO, YOUN-SOOK, SANG-AE SEUNG, MEE-JEONG KIM, JOO-YOUNG LEE und JIN-HO CHUNG: *Important role of glutathione in protecting against menadione-induced cytotoxicity in rat platelets*. Archives of Pharmacal Research, 19(1):12 – 17, Feb 1996.
- [144] ARMSTRONG, JEFFREY S: *Mitochondria: a target for cancer therapy*. British Journal of Pharmacology, 147(3):239 – 248, 02 2006.
- [145] MIGNOTTE, BERNARD und JEAN-LUC VAYSSIÈRE: *Mitochondria and apoptosis*. European Journal of Biochemistry, 252(1):1 – 15, 2001.
- [146] KIM, YUN JEONG, YONG KYOO SHIN, DONG SUEP SOHN und CHUNG SOO LEE: *Menadione induces the formation of reactive oxygen species and depletion of GSH-mediated apoptosis and inhibits the FAK-mediated cell invasion*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 387(9):799 – 809, Sep 2014.
- [147] HARVEY, CHRISTOPHER D., ANKA G. EHRHARDT, CRISTINA CELLURALE, HAINING ZHONG, RYOHEI YASUDA, ROGER J. DAVIS und KAREL SVOBODA: *A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(49):19264 – 19269, 2008.
- [148] POTTER, M., E. NEWPORT und K. J. MORTEN: *The Warburg effect: 80 years on*. Biochemical Society Transactions, 44(5):1499 – 1505, 2016.
- [149] EPSTEIN, T., R.A. GATENBY und BROWN J.S.: *The Warburg effect as an adaptation of cancer cells to rapid fluctuations in energy demand*. PLoS ONE, 12(9), 2017.
- [150] LUCEY, BRENDAN P., WALTER A. NELSON-REES und GROVER M. HUTCHINS: *Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination*. Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 133(9):1463 – 1467, 2009.
- [151] XIAO, C.-Y., B.-B. FU, Z.-Y. LI, G. MUSHTAQ, M. A. KAMAL und J.-H. LI: *Observations on the expression of human papillomavirus major capsid protein in HeLa cells*. Cancer Cell International, 15(53), 05 2015.
- [152] WILLIAMS, V. M., M. FILIPPOVA, V. FILIPPOV, K. J. PAYNE und P. DUERKSEN-HUGHES: *Human Papillomavirus Type 16 E6* Induces Oxidative Stress and DNA Damage*. Journal of Virology, 88(12):6751 – 6761, 2014.
- [153] FOPPOLI, CESIRA, FEDERICO DE MARCO, CHIARA CINI und M. PERLUIGI: *Redox control of viral carcinogenesis: The human papillomavirus paradigm*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1850(8):1622 – 1632, 2015.
- [154] DE MARCO, F.: *Oxidative Stress and HPV Carcinogenesis*. Viruses, 5(2):708 – 731, 2013.
- [155] LUCKE, B., M. G. LARRABEE und H. K. HARTLINE: *Studies on osmotic equilibrium and on the kinetics of osmosis in living cells by a diffraction method*. The Journal of General Physiology, 19(1):1 – 17, 1935.
- [156] SHERUB, PHUNTSHO, HONG SEUNGKWAN, ELIMELECH MENACHEM und KYONG SHON HO: *Osmotic equilibrium in the forward osmosis process: Modelling, experiments and implications for process performance*. Journal of Membrane Science, 453:240 – 252, 2014.

-
- [157] SUKENIK, SHAHAR, PIN REN und MARTIN GRUEBELE: *Weak protein–protein interactions in live cells are quantified by cell-volume modulation*. PNAS, 114(26):6776 – 5781, 2017.
- [158] ROBIN, EUGENE D. und JAMES THEODORE: *Intracellular and Subcellular Oedema and Dehydration*, Kapitel 16, Seiten 273 – 300. Wiley-Blackwell, 2008.
- [159] DEL BIGIO, MARC R. und DOMENICO L. DI CURZIO: *Nonsurgical Therapy for Hydrocephalus: A Comprehensive and Critical Review*. Fluids and Barriers of the CNS, 13, 2016.
- [160] SZYMANSKI, JEDRZEJ und MATTHIAS WEISS: *Elucidating the Origin of Anomalous Diffusion in Crowded Fluids*. Physical Review Letters, 103:038102, 07 2009.
- [161] GUIGAS, G. und M WEISS: *Sampling the Cell with Anomalous Diffusion—The Discovery of Slowness*. Biophysical Journal, 94(1):90 – 94, 2008.
- [162] BANKS, DANIEL S. und CÉCILE FRADIN: *Anomalous Diffusion of Proteins Due to Molecular Crowding*. Biophysical Journal, 89(5):2960 – 2971, 2005.
- [163] BERG, JONAS VAN DEN, ARNOLD J. BOERSMA und BERT POOLMAN: *Microorganisms maintain crowding homeostasis*. Nature Reviews Microbiology, 15(309):309 – 318, 03 2017.
- [164] SASAKI, YOSHIHARU, DAISUKE MIYOSHI und NAOKI SUGIMOTO: *Effect of molecular crowding on DNA polymerase activity*. Biotechnology Journal, 1(4):440 – 446, 2006.
- [165] KOUMANTAKIS, G. und L. E. WYNDHAM: *An evaluation of osmolality measurement by freezing point depression using micro-amounts of sample*. The Journal of Automatic Chemistry, 11(2):80 – 83, 1989.
- [166] BAJAR, B.T., E.S. WANG, S. ZHANG, M.Z. LIN und J. CHU: *A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs*. Sensors, 16(9):1488 – 1512, 2016.
- [167] ZHANG, M., R.R. NAIK und L. DAI: *Carbon Nanomaterials for Biomedical Applications*. Springer, 2016.
- [168] GUIGAS, GERNOT, CLAUDIA KALLA und MATTHIAS WEISS: *The degree of macromolecular crowding in the cytoplasm and nucleoplasm of mammalian cells is conserved*. FEBS Letters, 581(26):5094 – 5098, 2007.
- [169] SAITO, HARUO und FRANCESC POSAS: *Response to Hyperosmotic Stress*. Genetics, 192(2):289–318, 2012.
- [170] MODIG, TOBIAS, KATARINA GRANATH, LENNART ADLER und GUNNAR LIDEN: *Anaerobic glycerol production by Saccharomyces cerevisiae strains under hyperosmotic stress*. Applied Microbiology and Biotechnology, 75(2):289, 01 2007.
- [171] TEIF, VLADIMIR B. und KLEMEN BOHINC: *Condensed DNA: Condensing the concepts*. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 105(3):208 – 222, 2011.
- [172] COOK, P.R. und I.A. BRAZELL: *Supercoils in human DNA*. 19(2):261 – 279, 1975.
- [173] ZIMMERMAN, STEVEN B. und LIZABETH D. MURPHY: *Macromolecular crowding and the mandatory condensation of DNA in bacteria*. FEBS Letters, 390(3):245 – 248, 1996.
- [174] FINAN, JOHN und FARSHID GUILAK: *The Effects of Osmotic Stress on the Structure and Function of the Cell Nucleus*. 109:460–7, 01 2009.

- [175] WEISS, MATTHIAS, HITOSHI HASHIMOTO und TOMMY NILSSON: *Anomalous Protein Diffusion in Living Cells as Seen by Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Biophysical Journal, 84(6):4043 – 4052, 2003.
- [176] POUDRET, MATHIEU, JEAN-PAUL COMET, PASCALE GALL, FRANÇOIS KÉPÈS, AGNÈS ARNOULD und PHILIPPE MESEURE: *Exploring Topological Modelling to Discriminate Models of Golgi Apparatus Dynamics*. 10 2007.
- [177] POUDRET, MATHIEU, AGNÈS ARNOULD, JEAN-PAUL COMET, PASCALE LE GALL, PHILIPPE MESEURE, und FRANÇOIS KÉPÈS: *Topology-based abstraction of complex biological systems: application to the Golgi apparatus*. Theory in Biosciences, 127(2):79 – 88, 05 2008.
- [178] TIAN, Y., M. M. MARTINEZ und D. PAPPAS: *Fluorescence Correlation Spectroscopy: A Review of Biochemical and Microfluidic Applications*. Applied Spectroscopy, 65(4):115 – 124, 2011.
- [179] FRANCESCO, CARDARELLI und ENRICO GRATTON: *In Vivo Imaging of Single-Molecule Translocation Through Nuclear Pore Complexes by Pair Correlation Functions*. PLOS ONE, 5(5):1 – 12, 05 2010.
- [180] DIGMAN, MICHELLE A. und ENRICO GRATTON: *Imaging Barriers to Diffusion by Pair Correlation Functions*. Biophysical Journal, 97(2):665 – 673, 2009.
- [181] THOMAS, DERTINGER, PACHECO VICTOR, VON DER HOCHT IRIS, HARTMANN RUDOLF, GREGOR INGO und ENDERLEIN JÖRG: *Two-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy: A New Tool for Accurate and Absolute Diffusion Measurements*. ChemPhysChem, 8(3):433 – 443, 2007.
- [182] S., DITTRICH PETRA und SCHWILLE PETRA: *Spatial Two-Photon Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy for Controlling Molecular Transport in Microfluidic Structures*. Analytical Chemistry, 74(17):4472 – 4479, 2002.
- [183] SIEDENTOPF, H. und R. ZSIGMONDY: *Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen, mit besonderer Anwendung auf Goldrubingläser*. Annalen der Physik, 315, 1903.
- [184] JINWOO, LEE, MIYANAGA YUKIHIRO, UEDA MASAHIRO und HOHNG SUNGCHUL: *Video-Rate Confocal Microscopy for Single-Molecule Imaging in Live Cells and Superresolution Fluorescence Imaging*. Biophysical Journal, 103(8):1691 – 1697, 10 2012.
- [185] RÖMER, G.R.B.E. und P. BECHTOLD: *Electro-optic and Acousto-optic Laser Beam Scanners*. Physics Procedia, 56:29 – 39, 2014.
- [186] LD DIDACTIC GMBH: *Optik-Polarisation Pockels-Effekt*. www.ld-didactic.de.
- [187] PEGASUS OPTIK: *AO Deflectors Technical Data Sheet*, 2014. www.pegasus-optik.de.
- [188] COBOLT: *Data Sheet D0344-C*, 10 2016. www.cobolt.se.
- [189] NGOI, B. K. A., K. VENKATAKRISHNAN, B. TAN, P. STANLEY und L. E. N. LIM: *Angular dispersion compensation for acousto-optic devices used for ultrashort-pulsed laser micromachining*. Optics Express, 9(4):200 – 206, 08 2001.
- [190] CAMBRIDGE TECHNOLOGY: *62xxH Galvanometer Series*, 10 2016. www.cambridgetechnology.com.
- [191] LEICA: *Leica TCS SP8 Objective Brochure*, 09 2014. www.leica-microsystems.com.

- [192] THORLABS: *MLS203-1 Fast XY Scanning Stage*, 05 2017. www.thorlabs.de.
- [193] THORLABS: *MLS203 Slide/Petri Dish Holder*, 2010. www.thorlabs.com.
- [194] THORLABS: *BBD202 and BBD203 Brushless DC Servo Controllers*, 02 2016. www.thorlabs.com.
- [195] HAMAMATSU: *Photon Counting Head H7421 Series*. www.hamamatsu.com.
- [196] ANDOR TECHNOLOGY: *Rolling and Global Shutter Scientific CMOS*. www.andor.com.
- [197] <http://www.chroma.com>.
- [198] VISSER, T.D., G.J. BRAKENHOFF und F.C.A. GROEN: *The one-point fluorescence response in confocal microscopy*. *Optik*, 87(1):39 – 40, 1991.
- [199] KRESS, HOLGER: *Lichtstreuung und optische Kräfte an sphärischen und asphärischen Sonden im photonischen Kraftmikroskop*. Diplomarbeit, Universität Heidelberg, 2002.
- [200] ENDERLEIN, JOERG und W. PATRICK AMBROSE: *Optical collection efficiency function in single-molecule detection experiments*. *Applied Optics*, 36(22):5298 – 5302, Aug 1997.
- [201] SALEH, B.E.A. und M.C. TEICH: *Fundamentals of Photonics*. Wiley, 2007.
- [202] JOHNSON, L., S. MOORE und S. METZLER: *Effect of pinhole shape on projection resolution*. *Physics in Medicine and Biology*, 61(5), 2016.
- [203] KUIMOVA, MARINA K., GOKHAN YAHIOGLU, JAMES A. LEVITT und KLAUS SUHLING: *Molecular Rotor Measures Viscosity of Live Cells via Fluorescence Lifetime Imaging*. *Journal of the American Chemical Society*, 130(21):6672 – 6673, 2008.
- [204] WONG, FONG KUAN, CHRISTIANE HAFFNER, WIELAND B. HUTTNER und ELENA TAVERNA: *Microinjection of membrane-impermeable molecules into single neural stem cells in brain tissue*. *Nature Protocols*, 9:1170, 04 2014.
- [205] CHRISTIANSEN, ALEXANDER und PERNILLA WITTUNG-STAFSHEDE: *Synthetic crowding agent dextran causes excluded volume interactions exclusively to tracer protein apoazurin*. *FEBS Letters*, 588(5):811 – 814, 2014.
- [206] TOKURIKI, N., M. KINJO, S. NEGI, M. HOSHINO, Y. GOTO, I. URABE und T. YOMO: *Protein folding by the effects of macromolecular crowding*. *Protein Science*, 13(1):125 – 133, 2004.
- [207] SO, PETER T. C., CHEN Y. DONG, BARRY R. MASTERS und KEITH M. BERLAND: *Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy*. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2(1):399–429, 2000.
- [208] BERLAND, K. M., P. T. SO und E. GRATTON: *Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: method and application to the intracellular environment*. *Biophysical Journal*, 68(2):694–701, 1995.
- [209] PAWAR, NISHA, CLAUDIA DONTH und MATTHIAS WEISS: *Anisotropic Diffusion of Macromolecules in the Contiguous Nucleocytoplasmic Fluid during Eukaryotic Cell Division*. *Current Biology*, 24(16):1905 – 1908, 08 2014.
- [210] RICARDO, HENRIQUES, GRIFFITHS CARON, HESPER REGO E. und MHLANGA MUSA M.: *PALM and STORM: Unlocking live-cell super-resolution*. *Biopolymers*, 95(5):322 – 331.

- [211] JOHNNY, TAM und MERINO DAVID: *Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) in comparison with stimulated emission depletion (STED) and other imaging methods*. Journal of Neurochemistry, 135(4):643 – 658.

Abbildungsverzeichnis

1.1. Skizze einer typischen eukaryotischen Zelle	20
1.2. Jablonski-Diagramm	23
1.3. Der Stokes-shift	23
1.4. Skizze eines invertierten Epifluoreszenzmikroskops	27
1.5. Funktionsweise einer Lochblende zur Tiefendiskriminierung	28
1.6. Skizze eines invertierten Laser-Abtastmikroskops (LSM)	29
2.1. Strukturformel: DASPMI-Molekül	32
2.2. CellRox-DeepRed: Aktivierung des fluoreszenten Zustands	33
2.3. Skizze der hyperosmotischen Behandlung	35
2.4. Funktionsweise eines FRET-Sensors	35
3.1. Charakteristische Form einer TCSPC-Messung	38
3.2. Messmethode FLIM am Beispiel einer Zelle	39
3.3. Messmethode FLPM am Beispiel einer Zelle	40
3.4. Hintergrundkorrektur der Ankunftszeithistogramme	42
3.5. Charakteristik der Residuenfunktion	43
3.6. Phasor-Darstellung doppel-exponentieller Histogramme	45
3.7. Phasor-Darstellung mit niedrigem SNR	46
3.8. Vorbereitung der Ankunftszeithistogramme	48
3.9. Skalierungsverhalten der Lebenszeiten	50
4.1. K-Means-Zellkompartimentseparation	62
4.2. Phasorschnitte entlang der Regressionsgerade	65
4.3. DASPMI-Lebenszeitfraktionen aller Behandlungsarten	66
4.4. Intensitätsanalyse der Cisplatin Autofluoreszenz	69
4.5. Phasor-Slicing-Idee	70
4.6. Die Phasor-Slicing Methode	72
4.7. <i>Phasor-Slicing</i> Resultate	74
4.8. <i>Phasor-Slicing</i> unter Helligkeitsequilibrierung	76
5.1. Intensitätsbilder der HeLa- und U2OS-Zellen vor und nach der Menadion-Behandlung	82
5.2. FLPM-Messung in einer HeLa-Zelle	83
5.3. FLPM-Messung - CellRox-DeepRed - Laborzeit-Ankunftszeit-Zeitreihe $\tau_A(t)$	86
5.4. Ankunftszeit-Ankunftszeit-Korrelation der CellRox-DeepRed Photonenankunftszeiten	87
5.5. Verteilungen der CellRox-DeepRed-Parameter in HeLa-Zellen (DE-Fit)	92
5.6. Verteilungen der CellRox-DeepRed-Parameter in U2OS-Zellen (DE-Fit)	93
5.7. Verteilungen der CellRox-DeepRed-Parameter in HeLa-Zellen (Phasor)	96
5.8. Verteilungen der CellRox-DeepRed-Parameter in U2OS-Zellen (Phasor)	97
5.9. Zellensemble-Phasor Darstellung der CellRox-DeepRed Lebenszeiten in HeLa-Zellen	101

5.10. Zellensemble-Phasor Darstellung der CellRox-DeepRed Lebenszeiten in U2OS-Zellen . . .	102
6.1. Hyperosmotische Behandlung von HeLa-Zellen	113
6.2. FRET-Effizienzen E_{FRET} und Fraktionen λ_{DA} bei 0.3 Osm und 0.6 Osm	116
6.3. FRET-Effizienzen E_{FRET} und Fraktionen λ_{DA} bei 0.3 Osm und 0.8 Osm	118
6.4. Zunahme der FRET-Effizienzen in verschiedenen hyperosmotischen Stressszenarien . .	121
6.5. FRET-Differenzen in Abhängigkeit der Osmolaritätsdifferenzen - Modellbildung	123
6.6. Mikroskop-Konzeptskizze	133
7.1. Prinzip der invertierten Weitfeldfluoreszenzmikroskopie	135
7.2. Prinzip der Kommunikationsmessung durch PCF	136
7.3. Detailplan des Mikroskopaufbaus	138
7.4. Funktionsprinzip eines akustooptischen Deflektors (AOD)	139
7.5. Skizze eines Leica-Objektivs	141
7.6. Elementare Strahlführung und Keplersystem	144
7.7. Pfade der Punkt- und Lichtblattanregung	147
7.8. Detektionspfade der Punkt- und Lichtblattanregung	150
8.1. Punktspreizfunktion (<i>point spread function</i>)	153
8.2. Laterales Auflösungsvermögen im Beleuchtungspfad	155
8.3. Skizze des Detektionsschlitzes	157
8.4. Schnitte durch das Anregungs- und Detektionsprofil	159
8.5. Aufspaltung einer Zweipunkt-Fluktuationsmessung in zwei Zeitreihen	161
8.6. Theoretische Paarkorrelationsfunktion	162
8.7. Spannungsverlauf des Galvanometers beim Abtasten	163
8.8. Justagemöglichkeiten bei der Bildgebung - <i>Undersampling</i>	164
8.9. Justagemöglichkeiten bei der Bildgebung - <i>Oversampling</i>	165
8.10. Fluoreszenzaufnahme der Convallaria-Probe	166

Tabellenverzeichnis

3.1. Zusammenfassung der Experimente dieser Arbeit	56
4.1. Behandlungsspezifische Lebenszeiten von DASPMI in HeLa-Zellen	61
4.2. Signifikante Fraktionsverschiebungen der DASPMI-Lebenszeiten unter Behandlung . .	64
5.1. Zellensemblegröße der oxidativen Stressmessungen	81
5.2. Startwerte der doppel-exponentiellen Kurvenanpassung	84
5.3. Residuen: Vergleich einfach- und doppel-exponentieller Kurvenanpassung	85
5.4. Intensitätsspezifität von CellRox-DeepRed in HeLa- und U2OS-Zellen	88
5.5. CellRox-DeepRed Lebenszeitparameter. (DE-Fit)	91
5.6. Phasorauswertung der CellRox-DeepRed-Parameter in HeLa- und U2OS-Zellen	98
5.7. Lebenszeiten von CellRox-DeepRed in der Zellensemble-Phasor Betrachtung	100
5.8. Signifikante Änderungen der CellRox-DeepRed Parameterverteilungen	104
6.1. Regionsübergreifende Unterschiede der Donor-Akzeptor-Lebenszeiten und Fraktionen .	119
6.2. Regionsspezifische Unterschiede der FRET-Differenzen	121
6.3. Anstiegskonstanten und Grenzwerte der FRET-Effizienzzunahme	123
6.4. Zusammengefasste regionsübergreifende Unterschiede der Donor-Akzeptor-Parameter .	125

Abkürzungsverzeichnis

ACF	<i>autocorrelation function</i>
ADP	<i>adenosine diphosphate</i>
AF	<i>autofluorescence</i>
AOD	<i>acousto optical deflector</i>
APD	<i>avalanche photo diode</i>
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>
BFA	<i>back focal aperture</i>
BFP	<i>back focal plane</i>
CEF	<i>collection efficiency function</i>
cw	<i>continuous wave</i>
DASPMI	<i>4-[4-(Dimethylamino)Styryl]-N-Methylpyridinium Iodide</i>
DIC	<i>differential interference contrast</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i>
DNA	<i>desoxy-ribonucleic acid</i>
EOD	<i>electro optical deflector</i>
EPI	<i>epifluorescence microscopy</i>
ER	<i>endoplasmic reticulum</i>
FaLM	<i>flicker assisted light microscopy</i>
FCS	<i>fluorescence correlation spectroscopy</i>

FFT	<i>fast Fourier transformation</i>
FKS	<i>fetales Kälberserum</i>
FLIM	<i>fluorescence lifetime imaging microscopy</i>
FLPM	<i>fluorescence lifetime point measurement</i>
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
FT	<i>Fourier transformation</i>
FWD	<i>free working distance</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM	<i>galvanometer mirror</i>
HeLa	Henrietta Lacks - <i>human cervical carcinoma cells</i>
HEPES	<i>4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)</i>
HPV	<i>human papilloma virus</i>
IC	<i>internal conversion</i>
ICTS	<i>intramolecular charge transfer state</i>
IHC	<i>immunohistochemistry</i>
IRF	<i>instrument response function</i>
ISC	<i>intersystem crossing</i>
LES	<i>locally excited state</i>
LSM	<i>laser scanning microscope</i>
MDE	<i>molecule detection efficiency</i>
MSD	<i>mean squared displacement</i>
mtDNA	<i>mitochondrial DNA</i>
NA	<i>numeric aperture</i>
NaCl	<i>sodium chloride</i>
PALM	<i>photoactivated localization microscopy</i>

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCF	<i>pair correlation function</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD	<i>parfocal distance</i>
PMT	<i>photomultiplier tube</i>
PSF	<i>point spread function</i>
RICS	<i>raster image correlation spectroscopy</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SNR	<i>signal to noise ratio</i>
SOFI	<i>superresolution optical fluctuation imaging</i>
SPAD	<i>single photon avalanche diode</i>
SPIM	<i>single plane illumination microscopy</i>
STED	<i>stimulated emission depletion microscopy</i>
STORM	<i>stochastic optical reconstruction microscopy</i>
TCSPC	<i>time correlated single photon counting</i>
TGSPC	<i>time gated single photon counting</i>
TICTS	<i>twisted intramolecular charge transfer state</i>
U2OS	<i>human bone osteosarkoma epithelial cells</i>

Physikalische Größen

A_{scan}	Abgetastete Fläche in der Probenebene
$B(\vec{k})$	Apodisationsfunktion
c_{osm}	Osmolarität
d_{L}	Strahldurchmesser nach einer Linse
d_{LL}	Keplerabstand zweier Linsen
d_{s}	Schlitzbreite im Probenraum
$d_{\text{sheet}}^{\text{ex}}$	Lichtblattdicke in der Probenebene
d_{sensor}	Sensorbreite der sCMOS-Kamera
d_{r}	Breite der Schlitzblende im Realraum
d_0^{ray}	Position erster Nebenminima nach Rayleigh
d_{init}	Laserstrahl Initialdurchmesser
D_{PMT}	Sensordurchmesser des Photomultipliers
D_{a}	Apertur-Durchmesser des AOD
D_{s}	Dicke des Detektionsschlitzes
D_{Obj}	Apertur-Durchmesser des Objektivs
$D_{\text{i}}, D_{\text{o}}$	Durchmesser ein- und ausfallender Lichtstrahlen
D_{diff}	Diffusionskonstante
D_{mito}	Durchmesser der Mitochondrien
E_{det}	Detektionseffizienz
E_{FRET}	FRET-Effizienz
f_1, f_2	Vorfaktoren der Ankunftszeithistogramme
f_{ex}	Pulsfrequenz des Lasers
f_{scan}	Abtastfrequenz des Galvanometers
f_{D}	Vorfaktor des Donor-Ankunftszeithistogrammes
f_{DA}	Vorfaktor des Donor-Akzeptor-Ankunftszeithistogrammes
f_{a}	Modulationsfrequenz des TeO ₂ -Kristalls
f_{L}	Brennweite einer Linse
F	Pixelweise Fluoreszenzintensität
F_{m}	Modell der Kurvenanpassung
$g(\omega)$	Realteil der Phasor-Transformation
$G(\tau_{\text{k}})$	Paarkorrelationsfunktion (PCF)
$h_{\text{sheet}}^{\text{ex}}, h_{\text{sheet}}^{\text{det}}$	Angeregte und detektierte Lichtblatthöhe

h_r	Öffnungshöhe der Schlitzblende im Realraum
h_s	Schlitzhöhe im Probenraum
h_{sensor}	Sensorhöhe der sCMOS-Kamera
H_{opt}	Optische Achshöhe
I_k	Kontrast zweier PSF im Rayleigh-Abstand
I_{max}	Maximalwert des Beleuchtungsprofils im Realraum
I_n	Intensität der ersten Nebenmaxima der PSF
$I'(\vec{k})$	Beleuchtungsfunktion im Fourierraum
$I(\vec{r})$	Beleuchtungsfunktion im Realraum
$I_F(x, t)$	Fluoreszenzintensität einer Zeitreihe (PCF)
I_{av}	Mittlere pixelweise Helligkeit von CellRox-DeepRed
I_{corr}	Offset der Hintergrundkorrektur
\vec{k}	Wellenvektor
k_n	Radius der Ewald-Kugel
k_f	Rate des Fluoreszenzzerfalls
k_{nr}	Strahlungslose Zerfallskonstante
k_{quant}	Quenching-Konstante
k_{GM}	Galvanometer-Konstante
\mathcal{K}	Komplexität der numerischen Berechnung
\underline{L}	Matrix dünner Linsen (geometrische Optik)
L	Anzahl Lichtblätter
m	Variationskonstante des Fit-Algorithmus
m_0	Ideales Ankunftszeitinkrement nach dem Histogrammmaximum
$m_{\text{Lösung}}$	Masse einer Lösung
M_{Obj}	Objektivvergrößerung
M_{ges}	Gesamtvergrößerung
M_{rest}	Teleskopvergrößerung
M	Gesamtzahl der Verschiebungswerte des Fit-Algorithmus
n_{osm}	Anzahl osmotisch aktiver Teilchen in einer Lösung
n	Brechungsindex des Immersionsmediums
N_x, N_y	Anzahl Pixel in x-, y-Richtung
N_{phot}	Photonenzahl
N_s	Glättungsfaktor
N_{av}	Anzahl der Mittelungsschritte (<i>imaging</i>)
N_{bins}	Maximalzahl verfügbarer Zeitinkremente
N_{hist}	Anzahl transformierter Histogramme
N_h	Anzahl verwendeter Zeitinkremente
$N(\tau_A)$	Ankunftszeithistogramm
N_{pos}	Anzahl der Messorte
N_{cell}	Zellensemblegröße
N_{per}	Perioden einer Zeitreihe (PCF)
N_{px}	Anzahl zeitlicher Messinkremente
NA	Numerische Apertur des Objektivs
p_s	Pixelgröße
$p(\lambda)$	Phasorschnitt

PH	Pinhole-Größe
Q_A	Quantenausbeute
Q	Anzahl ausgelesener Kamerapixel
r	Abstand des Donors und Akzeptors
$r(t)$	Diffusive Verschiebung (MSD)
r_0	Lateraler Radius der PSF
r_n	Position der ersten Nebenminima der PSF
R_1, R_2	Mittlerer und maximaler AF-Einfluss
R_F	Förster-Radius
R_{det}	Zählrate (TCSPC)
R_{res}	Verhältnis der Residuen von SE-Fit und DE-Fit
$R(m)$	Residuenfunktion
R_{read}	Aufnahmerate der Kamera
R_{dark}	Dunkelzählrate (PMT)
\vec{R}	Strahlvektor in der geometrischen Optik
s_E	Fehler des Ensemblemittelwertes
s_F	Fehler über das Fehlerfortpflanzungsgesetz
s_D	Fehler der Differenz zweier Größen
s_{harp}	Auflösungsfehler des TCSPC-Systems
$s(\omega)$	Imaginärteil der Phasor-Transformation
S	Streckungsfaktor des konfokalen Volumens (FCS)
S_0	Elektronischer Grundzustand eines Fluorophors
S_1, S_2	Erster, zweiter elektronisch angeregter Zustand eines Fluorophors
t	Laborzeit
t_0	Zeitnullpunkt der Behandlung
t_{int}	Belichtungszeit der Kamera
$T(\vec{k})$	Transmissionsfunktion
T_{ex}	Ausgewertetes Zeitintervall des Ankunftszeithistogrammes
T_{switch}	Umschaltzeit zwischen AOD- und Lichtblattpfad
T_x	Messzeit an einem festen Ort
T_1	Erster angeregter Triplettzustand eines Fluorophors
T_{mess}	Experimentelle Messzeit
T_{GM}	Periodendauer des Galvanometers
T_{BILD}	Periodendauer der Bildaufnahme
\underline{T}	Transfermatrix optisch freier Wegstrecken
U	Steuerspannung des Galvanometers
U_L	Spannungsinkrement des Galvanometers
U_{acc}	Beschleunigungsspannung (PMT)
v_a	Propagationsgeschwindigkeit akustischer Wellen
$V_{\text{Lösung}}$	Volumen einer Lösung
V	Strahlversatz parallel zu der optischen Achse
V_{kon}	Konfokales Volumen
x_{pos}	Intensitätsposition in x-Richtung
z_{pos}	Intensitätsposition in z-Richtung
z_0	Radius der berechneten PSF in axialer Richtung

Griechische Symbole

α	Signifikanzniveau
α_i, α_o	Ein- und Ausfallswinkel von Lichtstrahlen
α_a	Anomalieparameter der Diffusion
α_{NA}	Maximaler Öffnungswinkel des Objektivs
β_o	Detektionswinkel der Fluoreszenz
γ_o	Ablenkungswinkel des akustooptischen Deflektors
Γ	Kompartimentviskosität
δ, Δ	Unterschiede / Differenzen
Δ_{phasor}	Phasorpunkteabstand im komplexen Zahlenraum
δ_K	Kumulativer Fehler bei der AF-Messung
δ_i, δ_o	Ein- und Ausfallswinkel des Lichtblattes
ζ	AF-Mittelwert der Standardabweichungen
λ	Lebenszeitfraktion
λ_1, λ_2	Fraktion der kleinen und großen Lebenszeit
λ_{max}	Häufigste Fraktion im Phasorschnitt
λ_g, λ_r	Lebenszeitfraktion im grünen und roten Kanal
$\lambda_{\text{ex}}, \lambda_{\text{det}}$	Anregungs- und Detektionswellenlänge
$\lambda_{p,r,m}$	Separationsgrenze der Phasorwolke im roten Kanal
λ_{DA}	Lebenszeitfraktion des Donor-Akzeptor-Paares
$\langle \lambda \rangle_g$	Separationsgrenze der Phasorwolke im grünen Kanal
μ	Pixelweiser Mittelwert bei der AF-Untersuchung
ξ	Ensemblemittelwert bei der AF-Untersuchung
ξ_1, ξ_2, ξ_3	Rotationsfreiheitsgrade des DASPMI-Moleküls
ξ_{st}	Streckungsfaktor der Fit-Funktion
σ_ξ	Standardabweichung der Ensemblemittelwerte
σ_ζ	Standardabweichung der Standardabweichungen
τ_1, τ_2, τ_3	Erste, zweite, dritte Fluoreszenzlebenszeit
τ_A	Photonenankunftszeit
$\tau_{A,i}$	Erste Ankunftszeit eines Zeitfensters
$\tau_{A,id}$	Idealer Startzeitwert der Kurvenanpassung
$\tau_{A,s}, \tau_{A,e}$	Beginn und Ende der Hintergrundkorrektur
$\tau_{A,c}$	Durch die Glättung korrigierte Ankunftszeit
$\tau_{A,\text{max}}$	Häufigste Ankunftszeit des Ankunftszeithistogrammes
τ_k	Zeitliche Verschiebung der Korrelationsfunktion
τ_D, τ_{DA}	Lebenszeit des Donors und Donor-Akzeptor-Paares
$\tau_{\Delta c}$	Anstiegskonstante der FRET-Effizienz
τ_{diff}	Mittlere Transitzeit durch ein konfokales Volumen
τ_{com}	Transitzeit von Fokus 1 zu Fokus 2 (PCF)
τ_a	Umschaltzeit des akustooptischen Deflektors
φ_i	Objektiv-Beleuchtungswinkel im AOD-Pfad
ω	Kreisfrequenz der Phasor-Transformation
ω_0	Strahlbreite direkt vor dem Objektiv

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Weiterhin erkläre ich, dass ich die Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern, Promotionsvermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe, noch zukünftig in Anspruch nehmen werde.

Zusätzlich erkläre ich, dass ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe. Diese Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Bayreuth, den 06.12.2018

Andreas Veres